



**STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUŞLARININ PFGE (PULSED FIELD JEL
ELEKTOFOREZ) TEKNİĞİYLE MOLEKÜLER İLİŞKİLENDİRİLMESİ**

Göksel TEKİNASLAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2020

Göksel TEKİNASLAN tarafından hazırlanan “*STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SUŞLARININ PFGE (PULSED FIELD JEL ELEKTOFOREZ) TEKNİĞİYLE MOLEKÜLER İLİŞKİLENDİRİLMESİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Başkan: Prof. Dr. Erkan YILMAZ

Temel Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Üye: Prof. Dr. Şule COŞKUN CEVHER

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Tez Savunma Tarihi: 30/01/2020

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Sena YAŞYERLİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Göksel TEKİNASLAN

30/01/2020

STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUŞLARININ PFGE (PULSED FIELD JEL ELEKTOFOREZ) TEKNİĞİYLE MOLEKÜLER İLİŞKİLENDİRİLMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Göksel TEKİNASLAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2020

ÖZET

S.aureus toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olan önemli patojenlerden biridir. Moleküler tiplendirme metodlarından olan PFGE, çeşitli patojenlerin epidemiyolojisi, genom büyüklüklerinin belirlenmesi, bakteri kromozomlarının fiziksel ve genetik haritalandırılmasında altın standart olarak kabul edilen bir metottur. Bu çalışmada çeşitli klinik örneklerinden izole edilmiş *S.aureus* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları ve PFGE yöntemiyle klonal ilişkilerinin saptanması amaçlanmıştır. Çalışmaya 55 hastanın yara, kan, steril vücut sıvısı, aspirat örneklerinden izole edilen 60 *S.aureus* dahil edildi. Konvansiyonel metodlarla ve MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics) cihazı ile izolatların tür tayini yapıldı. Antimikrobiyallere duyarlılıkları disk difüzyon metodu ile EUCAST 2019 önerileri doğrultusunda yapıldı. Suşların klonal ilişkisinin değerlendirilmesinde *SmaI* restriksiyon endonükleaz kullanılarak PFGE yöntemi kullanıldı. Çalışmaya dahil edilen 60 izolatın %60'ı yara,%28,3'ü kan,%11,7'si diğer klinik örneklerden izole edildi. Çalışmaya alınan örnekler en sık deri ve yumuşak doku lezyonlarından (n= 33;%63.5) ve kan örneklerinden (n=10; %19.2) izole edildi. Örneklerin antibiyotik direnç dağılımları değerlendirildiğinde %96'sı ampisiline, %11.5'i eritromisine, %9.6'sı tetrasikline, %5.8'i klindamisin/siprofloksasine, %3.8'i trimetoprim/sulfametoksazol/Amoksisilin-klavulanik asit/fusidik asite, %1.9'u amikasin/ gentamisin/rifampin/sefalotine dirençli olarak saptandı. Bir izolatta metisilin direnci tespit edildi ve bu izolat tüm antimikrobiyallere dirençli olarak belirlendi. Bir izolatla indüklenebilir klindamisin direnci saptanırken, hiçbirinde QD, linezolid, vankomisin direnci tespit edilmedi. PFGE analizinde büyüklükleri yaklaşık 32 ile 736 kb arasında değişen en az 10 en fazla 17 bant oluştuğu izlendi. Buna göre izolatlar 5 ana grupta (A-E) 12 farklı pulsotipe ayrıldı. PFGE analizine göre suşların yakın ilişkili olmadığı ve salgın niteliği taşımayan hastane ve ya çeşitli kaynaklardan kazanılmış toplum kaynaklı izolatlar olduğu belirlenmiştir. İzolatların neredeyse tamamının penisiline dirençli olduğu, bu nedenle ampirik terapide penisilin yerine amoksisilin-klavulanik asitin etkili olacağı izlenmiştir. Sağlık kuruluşlarında lokal izolatların PFGE paternlerinin düzenli olarak takibinin başta *S.aureus* olmak üzere hastane ilişkili enfeksiyonların kontrolü açısından yararlı olabileceği ve salgın durumunda salgın suşlarının sporadik suşlardan ayırt edilmesinde faydalı olabileceği düşünülmüştür.

Bilim Kodu : 20325

Anahtar Kelimeler : *S.aureus*, PFGE, Antibiyotik Duyarlılık

Sayfa Adedi : 117

Danışman : Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN

MOLECULAR ASSOCIATION OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS STRAINS BY PFGE
(PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS) TECHNIQUE

(M. Sc. Thesis)

Göksel TEKİNASLAN

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

January 2020

ABSTRACT

S.aureus is an important pathogen causing community and nosocomial infections. Pulsed field gel electrophoresis, which is one of the molecular typing methods, is accepted as the gold standard in the epidemiology of various pathogens, determination of genome sizes and physical and genetic mapping of bacterial chromosomes. The aim of this study was to determine the antibiotic susceptibility and clonal relationships of *S.aureus* strains isolated from various clinical specimens by PFGE method. Fifty-five *S.aureus* isolated from wound, blood, sterile body fluid and aspirate samples of 55 patients were included in the study. Species were determined by conventional methods and MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics). Antimicrobial susceptibility was determined by disc diffusion method according to EUCAST 2019 recommendations. Strains isolated from wound, blood and other clinical specimens were included in the study. Most of the samples were isolated from skin and soft tissue lesions (n = 33; 63.5%) and blood samples (n = 10; 19.2%). When antibiotic resistance distributions of the samples were evaluated, 96% ampicillin, 11.5% erythromycin, 9.6% tetracycline, 5.8% clindamycin / ciprofloxacin, 3.8% trimetoprim / sulfamethoxazole / Amoxicillin-clavulanic acid / fusidic acid, 1.9% u amikacin / gentamicin / rifampin / cephalotin resistant. Methicillin resistance was detected in one isolate which was resistant to all antimicrobials. While inducible clindamycin resistance was detected in one isolate, none of them had QD, linezolid and vancomycin resistance. PFGE analysis showed that at least 10 and 17 bands were formed between 32 and 736 kb in size. Accordingly, the isolates were divided into 12 different pulsotypes in 5 main groups (A-E). According to PFGE analysis, the strains were not closely related and were non-epidemic and community-acquired isolates obtained from various sources. Almost all of the isolates were resistant to penicillin, so amoxicillin clavulanic acid was effective instead of penicillin in empirical therapy. It is thought that regular follow-up of PFGE patterns of local isolates in health care facilities may be useful for controlling hospital-related infections, particularly *S.aureus* , and may be useful in differentiating outbreak strains from sporadic strains.

Science Code : 20325

Key Words : *S.aureus*, PFGE, Antibiotic Susceptibility

Page Number : 117

Supervisor : Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren desteğini benden esirgemeyen değerli danışman hocam Sn. Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN' a teşekkürlerimi sunarım.

Tezim için gerekli materyallerin toplanması aşamasında bana yardımcı olan Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı, Ulusal AIDS Doğrulama ve Viral Hepatitler Referans Laboratuvarı sorumlusu Sn. Doç. Dr. Tulin DEMİR' e teşekkürü borç bilirim.

Tezim için toplanan materyallerin saklanması ve laboratuvar kullanımına izin vererek benden desteğini esirgemeyen Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanı Sn. Prof. Dr. Selçuk KILIÇ' a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin yazım aşamasında her türlü teknik, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen eşim Sn. Bil. Uzm. Bio. Nihal ALEM TEKİNASLAN' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
RESİMLERİN LİSTESİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Tarihçe.....	5
2.2. Sınıflandırma.....	6
2.3. Genel Özellikleri	6
2.3.1. Morfoloji, boyanma ve kültür özellikleri	6
2.3.2. Biyokimyasal özellikleri	8
2.4. Hücre Yapıları ve Virülans Faktörleri.....	9
2.4.1. Kapsül.....	9
2.4.2. Hücre duvarı.....	9
2.4.3. Protein A	11
2.4.4. Fibronektin bağlayan proteinler	11
2.5. Enzimleri	11
2.5.1. Katalaz	11
2.5.2. Koagülaz	11
2.5.3. Hiyaluronidaz.....	12

	Sayfa
2.5.4. Lipaz.....	12
2.5.5. Deoksiribonükleaz	12
2.5.6. Stafilokinaz	12
2.5.7. Penisilinaz	12
2.5.8. Slime faktör.....	13
2.5.9. Fosfatid-spesifik fosfalipaz inositol C	13
2.5.10. Termostabil nükleaz	13
2.6. Toksinleri	13
2.6.1. Membran yıkımlayıcı toksinler.....	14
2.7. Epidemiyoloji.....	17
2.8. <i>Staphylococcus aureus</i> 'un Neden Olduğu Hastalıklar.....	18
2.8.1. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları	19
2.8.2. Toksinlere bağlı olarak ortaya çıkan enfeksiyonlar	21
2.8.3. Stafilokokların invazyonu ile oluşan enfeksiyonlar.....	22
2.8.4. Solunum Sistemi Enfeksiyonları.....	22
2.8.5. Kemik ve eklem enfeksiyonları	23
2.8.6. Üriner sistem enfeksiyonları	23
2.9. <i>S.aureus</i> 'un Laboratuvar Tanısı	24
2.9.1. Gram boyama ve mikroskopik inceleme	24
2.9.2. Kültür	24
2.9.3. Katalaz testi.....	24
2.9.4. Koagülaz testi.....	25
2.9.5. Deoksiribonükleaz (DNaz) testi.....	26
2.9.6. Termostabil endonükleaz testi	26
2.9.7. Mannitol fermentasyonu	26
2.9.8. Protein A saptanması	27

	Sayfa
2.9.9. Metisilin direncinin belirlenmesi	27
2.9.10. Moleküler yöntemler	27
2.9.11. Otomatize cihaz sistemleri	28
2.10. <i>S. aureus</i> Tedavisinde Kullanılan Antibiyotikler	28
2.10.1. Hücre duvarı sentez inhibitörleri	28
2.10.2. Protein sentez inhibitörleri	31
2.10.3. Nükleik asit sentezini inhibe edenler	33
2.11. <i>S.aureus</i> 'da Antibiyotiklere Direnç	35
2.11.1. İlacın hedefine etkili miktarda gönderilmesinin engellenmesi	36
2.11.2. Penisilin Bağlayan Protein (PBP) moleküllerinin değişmesi	36
2.11.3. İlacı inaktive eden beta laktamazların üretimi	37
2.12. MRSA'nın Epidemiyolojisi	41
2.13. <i>S.aureus</i> 'u Tiplendirme Yöntemleri	43
2.13.1. Fenotipik yöntemler	44
2.13.2. Genotipik yöntemler	48
3. GEREÇ VE YÖNTEM	65
3.1. Deney Grubu	65
3.2. Gerekli Cihazlar	66
3.3. Gerekli Solüsyonlar	66
3.3.1. Etilen diamin tetra asetik asit	67
3.3.2. TBE	67
3.3.3. Gel loading buffer.	67
3.3.4. Tris.	67
3.3.5. 1M NaCl	68
3.3.6. TE buffer.	68
3.3.7. Hücre süspansiyon. tamponu	68

	Sayfa
3.3.8. Lizis 1 solusyonu	68
3.3.9. Lizis 2 solusyonu	68
3.3.10. Sarkozin	68
3.4. Gerekli Besiyerleri	69
3.4.1. Kanlı agar	69
3.4.2. Mueller- hinton agar.....	69
3.4.3. Brain hearth infusion broth	69
3.4.4. Tryptone soy broth	69
3.5. Gerekli Reaktifler	69
3.6. Kullanılan Antibiyotikler	70
3.7. Yöntem	70
3.7.1. Suşların MALDİ TOF MS ile doğrulanması	70
3.7.2. Antibiyotik duyarlılık deneyi	71
3.7.3. PFGE yapılması	72
3.8. Araştırma Bulguları.....	80
4. TARTIŞMA	89
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	97
KAYNAKLAR	99
ÖZGEÇMİŞ	117

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. <i>S. aureus</i> ‘un biyokimyasal ve diğer temel özellikleri	8
Çizelge 2.2. <i>S. aureus</i> ’un diğer stafilocok türleri ile karşılaştırılması	8
Çizelge 2.3. Stafilocokların virulans faktörleri.....	9
Çizelge 2.4. <i>S.aureus</i> ‘un neden olduğu infeksiyonlar	18
Çizelge 2.5. Stafilocok infeksiyonlarının tedavisinde kullanılabilecek antibiyotiklerin gruplandırılması.....	28
Çizelge 2.6. TK-MRSA ve HK-MRSA arasındaki farklılıklar	43
Çizelge 3.1. <i>S.aureus</i> suşlarının özellikleri.....	81
Çizelge 3.2. <i>S.aureus</i> suşlarının servis ve kliniklere göre dağılımı	82
Çizelge 3.3. <i>S.aureus</i> suşlarının antibiyotiklere direnç oranları	84
Çizelge 3.4. <i>S.aureus</i> suşlarının pulstotiplere göre dağılımı.....	84

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. <i>S.aureus</i> 'un hücre duvar yapısı.....	10
Şekil 2.2. PFGE yönteminin çalışma basamakları	51
Şekil 2.3. PFGE sistemlerinin çeşitleri	52
Şekil 2.4. MLST analizinin yapılması	59
Şekil 2.5. MLST analizi	59
Şekil 2.6. Proteina A agen aharitası	60
Şekil 3.1. MHA besiyerine ekim.....	71
Şekil 3.2. PFGE yönteminin basamakları	72
Şekil 3.3. CHEF DR-III sistemi	79
Şekil 3.4. <i>S.aureus</i> suşlarının klinik örneklere göre dağılımı	82
Şekil 3.5. <i>S.aureus</i> suşlarının cinsiyete göre dağılımı	83

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Gram boyama tekniği ile görüntülenen <i>S.aureus</i>	7
Resim 2.2. <i>S.aureus</i> 'un kanlı agardaki beta hemolitik kolonileri.....	7
Resim 3.1. Saf kültür halinde üreyen <i>S.aureus</i> 'ların hücre süspansiyon tamponu içinde süspanse edilmesi	73
Resim 3.2. Bakteri yoğunluğunun spektrofotometrede ayarlanması	73
Resim 3.3. <i>S.aureus</i> kalıplarının hazırlanması.....	74
Resim 3.4. Hücre/agoroz karışımının kalıplara pipetlenmesi	75
Resim 3.5. Bakterilerin kalıptan çıkarılarak lizis solüsyonuna yerleştirilmesi.....	75
Resim 3.6. Agoroz kalıpların TE ile yıkanması	76
Resim 3.7. Agoroz kalıpları içindeki DNA'nın SmaI enzimi ile kesilmesi.....	77
Resim 3.8. PFGE sertifikalı agoroz kalıpların hazırlanması.....	78
Resim 3.9. Agoroz kalıpların jel içine yerleştirilmesi	78
Resim 3.10. PFGE tankına yükleme	79
Resim 3.11. Sonuçların görüntülenmesi	80
Resim 3.12. PFGE sonrası <i>S.aureus</i> suşlarına ait DNA bant görüntüleri.....	85
Resim 3.13. PFGE sonrası <i>S.aureus</i> suşlarına ait dendogram görüntüsü	86

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler Açıklamalar

µl	Mikrolitre
bç	Baz Çifti
cm²	Santimetrekare
gr	Gram
mg	Miligram
ml	Mililitre
nm	Nanometre
V	Volt
µg	Mikrogram

Kısaltmalar Açıklamalar

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
BHIB	Brain Heart Infusion Broth
BURST	Based Upon Related Sequence Types
CAMP	Cyclic Adenosine Monophosphate
CDC	Center for Disease Control
CFLP	Cleavage Fragment Length Polymorphism
CHEF	Counter Clamped Homogenous Electric Field
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CRF	Coagulase-Reacting Factor
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	Etilen daimin tetra asetik asit
ET	Eksfoliyatif toksin
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FIGE	Field-Inversion Gel Electrophoresis
FnBP	Fibronektin Bağlayıcı Proteinler

Kısaltmalar	Açıklamalar
HK-MRSA	Hastane Kaynaklı MRSA
HST	Hücre Süspansiyon Tamponu
IL	Interlökin
KNS	Koagülaz Negatif Stafilokok
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization time-of- flight
MHA	Mueller Hinton agar
MHC	Major Histocompatibility Complex
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MLEE	Multilokus Enzim Elektroforezi
MLST	Multi Locus Sequence Typing
MRSA	Metisilin Rezistans <i>Staphylococcus aureus</i>
MSA	Mannitol Salt Agar
MSSA	Metisilin Sensitif <i>Staphylococcus aureus</i>
NAG	N-asetil Glukozamin
NAM	N-Asetil Muramik Asit
OFAGE	Orthogonal Field Alternation Gel Electrophoresis
PABA	Para Amino Benzoik Asit
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PBP	Penisilin Bağlayan Proteinler
PCR	Polimerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis (Değişken Alanlı Jel Elektroforezi)
PVL	Panton-Valentine Lökosidin
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RE	Restriksiyon Enzimleri
REA	Restriksiyon Enzim Analizi
REAP	Restriction Enzyme Analysis of Plazmids
RFLP	Restriksiyon Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribo Nükleik Asit
SCC	Staphylococcal Cassette Chromosome
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulphate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis
SSR	Short Sequence Repeat
ST	Sequence Type

Kısaltmalar**Açıklamalar**

ST/RIDE	Simultaneous Tangential/Rectangular Inversion Decussate Electrophoresis
TAFE	Transverse Alternating Field Electrophoresis
TBE	Tris Borat Edta
TK-MRSA	Toplumdan Köken Alan MRSA
TSB	Trypton Soy Broth
TSST	Toksik Şok Sendrom Toksin
VISA	Vankomisine Orta Derecede Dirençli <i>S. aureus</i>
VRSA	Vankomisine Dirençli <i>S. aureus</i>
YBÜ	Yoğun Bakım Üniteleri

1. GİRİŞ

Staphylococcus aureus toplum ve hastane kökenli enfeksiyonlara neden olarak, tedavisinde kullanılan çoğu antimikrobiyal ajanlara direnç geliştirebilen önemli ve tehlikeli bir patojendir. Bu patojenin tedavide kullanılan antibiyotiklere hızla direnç kazanmış olması dünya genelinde, enfeksiyonlardaki ölüm hızını ve hastalığın yayılımını arttırmaktadır [1,2].

S.aureus besin ile zehirlenmeler, yumuşak doku ve deri enfeksiyonları gibi hafif seyirli enfeksiyonların yanı sıra, sepsis, endokardit, pnömoni, toksik şok sendromu gibi ciddi seyirli durumlara yol açabilen ayrıca normal flora elemanı olarak da sıklıkla izlenen bir mikroorganizmadır [3,4]. Bununla birlikte sağlıklı kişilerde de kolonizasyona bağlı olarak endojen olarak enfeksiyonlara da neden olabilmektedir [5].

S. aureus suşlarının 1980'den bu yana antimikrobiyal duyarlılık paternlerinde çok sayıda değişiklik meydana gelmiştir. Bu durumlarından en önemlisi *S.aureus* suşlarındaki metisilin direncidir [6]. Metisilin direnci, Stafilokoklarda 1961 yılında tanımlanmıştır. Metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) suşları, 1970'lerin başından itibaren yaygın olarak kullanılan bir çok antibiyotiğe karşı dirençli hale gelmeye başlamıştır. MRSA, çoklu antibiyotik direncinin getirdiği tedavi güçlüğü ve nozokomiyal epidemilere yol açabilen bir patojen olması nedeniyle dünya çapında ciddi bir sağlık sorunu haline gelmiştir [7,8].

Günümüzde hastanelerin yoğun bakım ünitelerindeki hastalardan izole edilen *S.aureus* suşlarının % 80'inin metisiline dirençli olduğu bilinmektedir [9]. İnsidans, tüm dünyada ülkeler arasında farklılık göstermektedir ve Fransa - Yunanistan gibi Avrupa ülkelerinde % 80, ABD'de % 10-40, İtalya, Japonya'da ayaktan hastalarda % 20-40, yatan hastalarda % 60-70, İskandinav ülkelerinde % 1'in altında bildirilmektedir [10,11].

Hastanelerde enfeksiyona neden olan metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşlarının Türkiye'de ve dünyada en önemli kaynağı; hastane personeli, aile bireyleri ya da bu suşlarla enfekte veya kolonize olan hastalardır [12]. MRSA yayılımının önlenmesinde en etkili yol dikkatli el yıkama ve eldiven kullanmaktır [13].

Enfeksiyon hastalıklarının epidemiyolojisinde, olgulardan izole edilen mikroorganizmalar arasındaki epidemiyolojik ilişkinin gösterilmesi büyük önem taşımaktadır. Genellikle salgınlara yol açan etiyolojik ajanlar yakın ilişkili klonlardan köken almaktadır. Enfeksiyon etkenlerinin alt tiplerine göre sınıflandırılması, toplumsal ya da hastane kaynaklı salgınlara ve enfeksiyon kaynağının belirlenmesi ile yayılımının takibini, virülen suşların saptanmasını, enfeksiyon sebebiyle tedavi edilen hastalarda tekrar eden enfeksiyonun değerlendirmesini mümkün kılmaktadır [14,15].

Tiplendirme amacıyla 1980'lerin başlarına kadar fenotipik yöntemler kullanılmıştır. Bu yöntemler birbirinden ayırıştırma güçlerinin düşüklüğü, değişkenliklerin fazla olması, sonuçların çok geç elde edilmesi, özel ve yorucu laboratuvar çalışmalarına neden olması gibi nedenlerle yerini genotipik tiplendirme yöntemlerine bırakmaktadır. Genotipik tiplendirme yöntemlerinden olan "Pulsed Field Gel Electrophoresis"(PFGE) tekrarlanabilirliğinin yüksek ve ayırıştırma gücünün iyi olması nedeniyle birçok etiyolojik ajan için altın standart olarak kabul edilmektedir [15,16].

PFGE, Türkiye'de yapılan araştırmalarda en çok kullanılan moleküler tanımlama yöntemlerinin başında gelmektedir. PFGE ile genotiplendirme, *S.aureus* enfeksiyonlarının epidemiyolojik incelenmesinde fenotipik yöntemlerdeki birçok sıkıntıyı ortadan kaldırmıştır. Bu durumda epidemiyolojik açıdan veriler daha güvenilir bir biçimde temin edilebilmiştir [17].

2000'li yılların başından itibaren Türkiye'de metisilin dirençli *S. aureus* suşlarının epidemiyolojinin moleküler ayağını hedefleyen çeşitli araştırmalar yapılmaya başlanmıştır. Bu çalışmaların en büyük engeli suşların sadece yerel suşlarla sınırlı olmasıdır. Ergon ve arkadaşlarının 2002, 2003 ve 2004 yıllarını kapsayan araştırmasında İzmir Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'nden izole ettikleri metisilin dirençli suşlar arasında tek ana bir tipin egemen olduğunu belirtmişlerdir. Bu klonal tipin İskoçya'daki "MRSA Referans Laboratuvarı" kayıtlarına göre, dünyadaki diğer klonlar gibi olmadığı onlardan çok farklı olduğunu belirlemişlerdir [18]. Zarakolu ve arkadaşlarının 2002-2004 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesinde izole ettikleri 109 MRSA izolatu ile bir çalışma yapmışlardır. Zarakolu ve arkadaşları yaptıkları bu çalışmada PFGE ile 13 farklı klon bulduklarını bildirmişlerdir [19]. 2005-2006 yıllarında Alp ve arkadaşlarının Türkiye'de sekiz üniversite hastanesinin yer aldığı bir çalışmada 159 *S. aureus* izolatu

izole etmişlerdir. İzole edilen bu 159 izolattan 54'ünde metisilin dirençli *S.aureus* bulunduğu saptanmıştır. Bu isolatların birbirleri ile olan genetik ilişkileri çeşitli moleküler yöntemlerle incelenmiştir. PFGE yöntemiyle analizler sonucu bu 54 örneğin 23 farklı genotipe sahip olduğu belirlenmiştir [20]. Strommenger ve arkadaşları 2006 yılında 99 suş ile bir çalışma yapmışlardır. Yaptıkları bu çalışmadaki suşlar içerisinde metisilin dirençli *S.aureus* suşları da vardır. PFGE çalışması sonucunda 99 suşu 74 farklı grup altında toplamışlardır [21]. Tenover ve arkadaşları A.B.D'de metisiline duyarlı ve dirençli *S.aureus* suşlarının karakterizasyonu için burun kültürlerinden 4 yıl süreyle örnekler toplamışlardır. 2008 yılında topladıkları bu örnekleri PFGE metoduyla incelemişlerdir. İnceleme sonucu *S.aureus* 'un metisiline dirençli 8 farklı pulsotipi ve metisiline duyarlı 11 farklı PFGE pulsotipi belirlemişlerdir. [22]. Nuno A.Faria ve arkadaşları 2008 yılında metisilin dirençli ve duyarlı *S.aureus* suşlarını kullanarak bir PFGE çalışması yapmışlardır. Yaptıkları bu çalışma sonuçlarına göre *S.aureus* suşlarının metisiline dirençli olanlarında 32 pulsotip ve 92 alt pulsotip, metisiline duyarlı olanlarında 30 pulsotip ve 63 alt pulsotip belirlemişlerdir [23]. Akçimen ve arkadaşlarının 2010 yılında Adana Çukurova Eğitim ve Araştırma Hastanesinde yaptıkları çalışmada 46 MRSA izolatını PFGE yöntemiyle tiplendirmişler, 42 suşun aynı Major A kümesi içinde yer aldığı ve 4 suşun ilişkisiz olduğunu bulmuşlardır [24]. Bozdoğan ve arkadaşlarının 2013 yılında Türkiye'nin farklı coğrafi bölgelerinden 12 merkezden elde edilen 397 MRSA suşu ile yaptıkları çalışmada PFGE yaparak suşların klonal ilişkilerini araştırmışlar ve PFGE'de pulsotip A'nın 363 MRSA suşu ile Türkiye'deki MRSA isolatları arasında en yaygın pulsotip olduğunu, 18 suşun pulsotip B, 11 suşun pulsotip C'nin bunu takip ettiğini göstermişlerdir [25]. Mogadham ve arkadaşları 2017 yılında Tahran'da bir hastanede yatan hastaların yaralarından izole ettikleri 43 MRSA suşunu PFGE analizi ile incelemişler, 5 ortak tip 31 farklı pulsotip bulmuşlardır. Buna göre MRSA suşları arasında bir ilişki bulunmadığını, suşların farklı kaynaklardan geldiğini belirtmişlerdir [26]. Mohammed ve arkadaşlarının 2018 yılında Güney Afrika'daki bir hastanede kistik fibrozisli hastalardan izole ettikleri 33 *S.aureus* suşunu spa tiplendirme, PFGE ve MLST yöntemleriyle incelemişler, PFGE'de 2 major pulsotip (A ve C) ve 7 minor pulsotip olmak üzere 9 ayrı pulsotip bulmuşlardır [27]. Elçinin 2018 yılında, Hacettepe Üniversitesi Erişkin ve Onkoloji Hastaneleri'nde yatan hastalardan izole edilen MRSA suşlarıyla yaptığı çalışmada PFGE ile değerlendirilen 85 örneğin 53 tanesini bünyesinde barındıran dominant bir tip (Tip A) ve bu dominant tipin dışında daha az örnekle temsil edilen üç tip (Tip B, C,

D) bulmuştur. Tip A'nın 8, tip B'nin 2 ve tip C'nin 5 tane alt tipi mevcut olmak üzere 16 farklı klon tanımlamıştır [28].

Bu bilgiler ışığında tez çalışmamızda Ahi Evran Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne başvuran hastaların çeşitli numune örneklerinden izole edilmiş, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları'nın kültür koleksiyonlarında saklanan çeşitli bölgelere ait *S.aureus* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi ve PFGE yöntemiyle klonal ilişkilerinin saptanması hedeflenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Robert Koch, 1878’de stafilokokları ilk tanımlayan bilim insanıdır. Pasteur ise 1880’de sıvı besiyerinde üretmiştir [29]. Sir Alexander Ogston 1881’de stafilokokların deney hayvanlarında infeksiyonlara yol açtığını göstererek patojen olduğunu saptamış ve Yunanca "staphyle" (üzüm salkımı) anlamına gelen *Staphylococcus* cins adını vermiştir [30]. Rosenbach 1884 yılında insanlarda bir hastalığa neden olan bir etken olarak hasta örneklerinden ilk kez izole etmiştir [31]. Rosenbach beyaz renkli kolonileri *Staphylococcus albus*, sarı-portakal rengi kolonileri ise *Staphylococcus aureus* olarak isimlendirmiştir [29]. Bakterinin alfa toksini Kraus ve Clairmont tarafından 1900’de, beta toksini 1935’de Glenny ve Stevens tarafından bulunmuştur. Smith ve Price 1938’de gama ve Williams ile Harper ise 1947’de delta toksin varlığını açıklamıştır. 1978’de Todd ve arkadaşları yeni bir hastalık olarak “toksik şok sendromu” tanımlanmıştır. Koagülaz negatif stafilokok türleri ise ilk kez Baird-Parker tarafından tanımlanmıştır [32].

Alexander Fleming’in penisilini bulması (1928) ve 1940 yılında Forey ve Chain tarafından penisilinin büyük miktarlarda üretilmeye başlanması ile stafilokokal enfeksiyonların tedavisinde önemli bir aşama kaydedilmiştir [33]. Fakat 1944’de Kirby bilim dünyasını üzen bir bildiride bulunmuştur. Bu bildiriye göre, penisiline karşı etkili olan penisilnaz enzimini üreten stafilokokların varlığından bahsetmiştir. 1970 yılına doğru tüm kaynaklardan izole edilen suşların %80’inden fazlasında penisiline karşı direnç gelişmiştir. [34,35]. Penisilinin yanı sıra eritromisin, tetrasiklin, streptomisin gibi o dönemde kullanımda olan diğer antibiyotiklere de direnç gelişmiştir. Penisilnaz varlığı nedeniyle ortaya çıkan direnç sorunu, 1959 yılında β -laktamaz enzimine dayanıklı semisentetik bir penisilin olan metisilin ile çözülmüştür. Ancak bulunan bu çözüm de uzun sürmemiş ve 1961 yılında İngiltere’de ilk MRSA izolatı tanımlanmıştır [36]. Bu MRSA suşları 2000 yılına ulaşmadan dünya genelinde ve özellikle hastanelerde yayılmıştır [37].

2.2. Sınıflandırma

Önceleri *Staphylococcus* cinsi *Micrococcus*, *Planococcus* ve *Stomacoccus* cinsleri ile birlikte *Micrococcaceae* familyası içinde değerlendirilmiştir [38]. Fakat daha sonra moleküler tekniklerin gelişmesiyle birlikte yapılan DNA-ribozomal RNA hibridizasyonları, 16S rRNA sekans analizleri gibi genetik çalışmalar ve kemotaksonomik analizler (hücre duvarı kompozisyonu, hücresel yağ asitleri gibi) aslında bu mikroorganizmaların birbirlerinden farklı olduklarını göstermiş ve *Staphylococcus*'ların tek bir aile içinde toplanmaması gerektiğini ortaya koymuştur [39]. Bergey 2000 yılında Bergey's Manual of Systematic Bacteriology isimli bir kitap yayımlamıştır. Bu kitaba göre stafilokoklar şube olarak *Firmicutes*, sınıf olarak *Bacilli*, takım olarak *Bacillales*, aile olarak *Staphylococcaceae*, genus olarak Genus I de sınıflandırılmıştır [40].Günümüzde stafilokoklar 33 tür ve 13 alt türe ayrılmıştır. Stafilocoklar, mikrokoklardan anaerobik ortamda glukozdan asit oluşturmaları, furozolidon ve lizostafine duyarlı, lizozime dirençli olmaları ve 0,4 µg/ml eritromisin içeren ortamda gliserolden asit meydana getirmeleri ile ayrılırlar. Ayrıca mikrokokların aksine basitrasin dirençlidirler. *S.aureus* katalaz, koagülaz ve DNase pozitif olmasının yanı sıra mannitol ve trehalozdan asit oluşturarak da *S.epidermidis*'ten ayrılır [29,32].

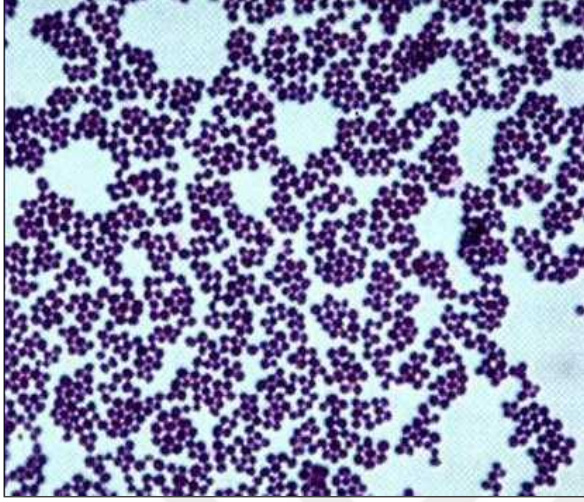
2.3. Genel Özellikleri

S. aureus, doğa koşullarına dayanıklı, doğada yaygın olarak, insanların deri, burun ve üst solunum yollarının normal florasında da bulunan mikroorganizmalardır [41]. *S. aureus*, insan ve hayvanlarda değişik klinik tablo ile seyreden, bir çok hastalığın etkeni olarak önem taşımaktadır [42].

2.3.1. Morfoloji, boyanma ve kültür özellikleri

S. aureus, 0,5-1,5 µm çapında yuvarlak-oval, hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz veya az miktarda kapsül içeren katalaz pozitif mikroorganizmalardır. Bakterilerin katı besiyerinde çoğalırken üç boyutta da bölünebilmeleri ve bölünmeden sonra tam ayrılmamanın gerçekleşmesi sonucu üzüm salkımına benzeyen yapılar oluşturur. Sıvı besiyerinde ise diplokoklar veya kısa zincirler halinde ürer. Anilin boyaları ve bazik boyalarla boyanırlar.

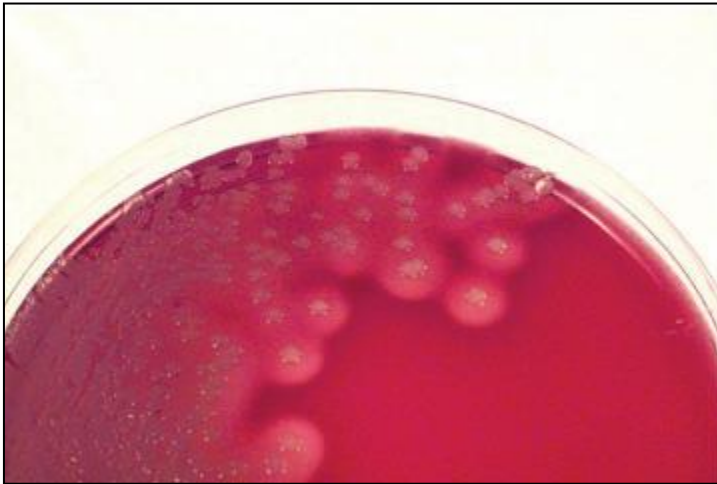
Gram pozitifler [43]. *S.aureus* izolatlarının Gram boyama görünümü Resim 2.1’ de gösterilmektedir.



Resim 2.1. Gram boyama tekniği ile görüntülenen *S.aureus* [44]

S. aureus hareketsiz, fakültatif anaerob olup spor oluşturmaz. Optimal üreme ısıları 30°C-37°C ve pH: 7-7,5’tur.

S. aureus, kanlı agarda ve seçici olmayan katı besiyerlerinde ürer. Kolonileri 1-4 mm çapında düz, opak ve hafif konveks ve “S” tipindedir. Koloni rengi genellikle krem rengi ile altın sarısı arasındadır. Kapsüllü suşlar mukoid koloni yapabilir. *S. aureus* kanlı agarda beta hemoliz yapar. Bu hemoliz uzun süreli inkübasyonlarda daha belirgin hale gelir [30,43].



Resim 2.2. *S.aureus* ’un kanlı agardaki beta hemolitik kolonileri [44]

2.3.2. Biyokimyasal özellikleri

Staphylococcus aureus'u insanda patojen olan diğer stafilocoklardan ayıran en önemli özelliği koagülaz üretmesidir. Koagülaz, sitratlı plazmayı pıhtılaştır. Üstelik *S. aureus* mannitolü fermente, kanı hemoliz ederken diğer patojenler bunları yapamaz [46]. Koagülaz pozitif *S. aureus*'un biyokimyasal ve diğer temel özellikleri Çizelge 2.1 de diğer stafilocok türleri ile karşılaştırılması Çizelge 2.2 de verilmiştir [29].

Çizelge 2.1. *S. aureus*'un biyokimyasal ve diğer temel özellikleri [29]

Özellik	<i>S.aureus</i>
Aerop üreme	+
Anaerop üreme	+
Hemoliz	+
Koagülaz	+
DNaz	+
Trehaloz mannitol fosfotaz agarda renk değişikliği	+
Novobiocin Duyarlılığı	+
Bacitracin Duyarlılığı	-
Astoin oluşturma	+
Mannitol	+
Trehaloz	+
Maltoz	+
Ksiloz	-
Sükroz	+
Laktoz	+
Cellobiose	-

Çizelge 2.2. *S. aureus*'un diğer stafilocok türleri ile karşılaştırılması [29]

	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>
Koagulaz	+	-	-
Anaerobik ortamda üreme ve glikoz fermentasyonu	+	+	-
Mannitol			
Aerobik ortamda asit üretimi	+	Değişken	Değişken
Anaerobik ortamda asit üretimi	+	-	-
α toksin	+	-	-
Isıya dayanıklı endonükleazlar	+	-	-
Hemoliz	+	-	-
Hücre duvarı			
Ribitol	+	-	+
Gliserol	-	+	Değişken
Protein A	+	-	-
Novobiosin hassasiyeti	Duyarlı	Duyarlı	Dirençli

2.4. Hücre Yapıları ve Virülans Faktörleri

S. aureus virulansı en yüksek olan stafilokok türüdür. Ancak infeksiyon olup olmaması mikroorganizmanın virulansı ile konak savunma sisteminin oluşturacakları dengeye bağlıdır [47]. Stafilokokların, kapsül, protein A, peptidoglikan tabakası, teikoik asit gibi hücre duvarında bulunan maddeler, oluşturdukları enzimler ve toksinler patojenitesinde etkili olup, virulans faktörü olarak rol oynamaktadır [48]. Stafilokokların virulans faktörleri Çizelge 2.3’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Stafilokokların virulans faktörleri [48]

Hücresel Bileşenler	Hücre Dışı Ürünler	
	Toksinler	Enzimler
1 - Kapsül	1 - Alfa toksin	1 - Koagülaz
2 - Protein A	2 - Beta toksin	2 - Stafilokinaz
3 - Elastin bağlayıcı protein	3 - Gama toksin	3 - Nükleaz - DNaz
4 - Kollajen bağlayıcı protein	4 - Delta toksin	4 - Hiyalüronidaz
5 - Fibronektin bağlayıcı protein	5 - Lökositidin (PV)	5 - Lipaz
6 - Kümeleştirici faktör	6 - Enterotoksinler	6 - β -Laktamaz
7 - Peptidoglikan	7 - Toksik şok sendromu toksini-1 (TSST-1)	7 - Proteaz (I, II, III)
8 - Teikoik asit	8 - Eksfoliatif toksin	8 - Fosfataz
9 - Lipoteikoik asit		9 - Lizozim
10 - Slime tabakası		10 - Laktat dehidrogenaz
		11 - Katalaz

2.4.1. Kapsül

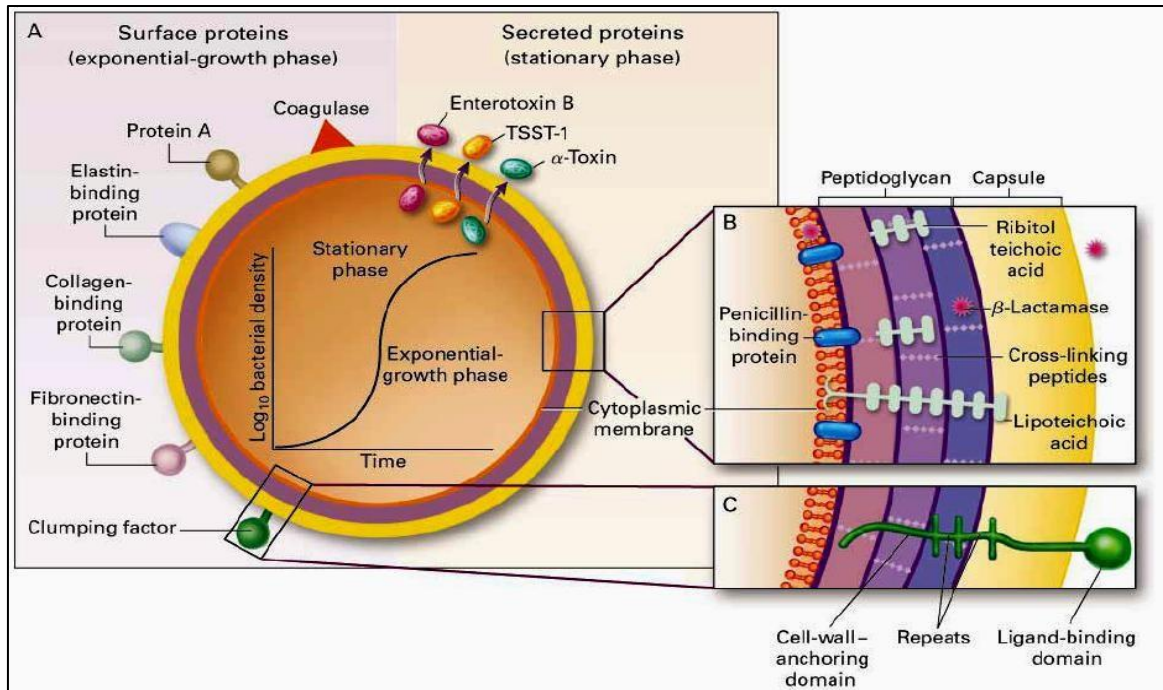
S. aureus bakterilerinin sahip olduğu mikrokapsül polisakkarit yapıdadır. Virülans özelliğine sahip bu mikrokapsül çeşitli savunma hücrelerine karşı bakteriyi korur. Bu kapsülün 11 farklı serotipi vardır [46]. Önemli enfeksiyonlara yol açan klinik örneklerin neredeyse %70-80’ni serotip 5 ve 8 tarafından oluşturulur. Oksasiline dirençli *S. aureus* suşlarının önemli bir kısmı serotip 5 kapsüller polisakkarit üretir. Ayrıca toksik şok sendromu toksini üretimi ile serotip 8’in yakın ilişkide oldukları gösterilmiştir [39].

2.4.2. Hücre duvarı

Stafilokok hücre duvarının başlıca yapısal bileşeni, peptid çapraz bağlı glikan zincirlerinden meydana gelen peptidoglikan tabakasıdır. Glikan zincirleri , yaklaşık 10-12 N-asetil glukozamin (NAG) ve N-asetil muramik asit (NAM) ünitelerinin dönüşümlü olarak dizilmeleri ile oluşan disakkarit zincirlerinden meydana gelmektedir. L-alanin , D-

glutamik asit, L-lizin ve D-alanil D-alanin aminoasitleri NAM'a bağlı peptid zincirini oluşturur. Stafilokok hücre duvarında bir penta peptit zincirde dördüncü pozisyonda bulunan D-alaninin karboksi terminali ile bir diğer pentapeptiddeki L-lizinin amin grubu pentaglisin köprüleri aracılığı ile çapraz bağlanır [29]. Çapraz bağlar hücre duvarının sağlamlığını belirler. Bu bağların yapısı türler arasında farklılık göstermektedir. *S. aureus*'da çapraz bağlantı oranının yüksek olması bakterinin lizozim enzimine karşı dirençli olmasını sağlamaktadır [49]. Peptidoglikan tabakası, mikroorganizmaya şeklini verir ve dayanıklılığını sağlar. Lökosit göçünü sağlar, fagositozu önler. Endotoksine benzer nitelikleri vardır; monositlerden intelökin salınımını, kompleman aktivasyonunu, opsonik antikorların üretimini indükler.

Peptidoglikan tabakanın dışında hücre duvarının diğer bir önemli bileşeni olan teikoik asit bulunmaktadır. Hücre duvarı teikoik asitleri *S. aureus*'ta N-asetilglukozaminin ribitol fosfat ünitidir. Teikoik asitler peptidoglikan yapıya kovalan olarak ya da sitoplazmik membrana lipidler aracılığıyla bağlanan polimerlerdir. Fibronektine bağlanma özelliği vardır. Bu fibronektin-bağlayıcı proteinler sayesinde mukozal yüzeylere ve doku matrikslerine tutunmaları mümkün olur. Suşların faj tiplendirmesinde teikoik asit reseptörlerinden de faydalanılır [29,46].



Şekil 2.1. *S.aureus* 'un hücre duvar yapısı [50]

2.4.3. Protein A

S.aureus 'da Protein A virölans yönünden çok önemlidir. Protein A, bakteri hücre duvarında yer alan peptidoglikan tabakasına kovalan bağlanır [39]. Protein A, bakterinin granülositler tarafından sindirilmelerini engeller [8]. Stafilokoklar, serbest, bağlı ve hücre dışı olmak üzere üç tip Protein A'ya sahiptir [29].

2.4.4. Fibronektin bağlayan proteinler

İlk olarak Kuusela tarafından 1978'de bildirilmiştir. FnbpA ve FnbpB olmak üzere birbirine benzeyen iki ayrı protein gösterilmiştir. Streptokoklardaki fibronektin bağlayıcı yüzey proteinleriyle yapısal olarak benzerlik gösterirler. FnbpB, bakterinin yapısında fibronektin bulunan substratlara yapışmasında yardımcı olur.

2.5. Enzimleri

S. aureus'un ürettiği birçok enzim vardır. Bu enzimler bakterinin hastalık yapma yeteneğinde yani virölansında rol oynar.

2.5.1. Katalaz

Bütün stafilokoklar (*S. saccharolyticus* ve *S. aureus subsp. anaerobius* hariç) miyeloperoksidaz sistemince düzenlenen toksik hidrojen peroksitin su ve oksijene dönüşümünü katalize eden katalaz enzimi üreterek fagositoza uğramış bakterinin oksijen radikalleri ile öldürülmesini engellerler [39].

2.5.2. Koagülaz

S. aureus suşlarında serbest koagülaz ve bağlı koagülaz (clumping factor-kümeleşme faktörü) olmak üzere iki şekilde bulunan ekstraselüler bir proenzimdir. Serbest koagülaz, CRF (coagulase reacting factor) ile reaksiyona girer ve bu faktör fibrinojenin fibrine dönüşümünü katalize eder. Bağlı koagülaz (clumping factor), doğrudan fibrinojeni fibrine dönüştürebilir ve stafilokokların kümeleşmesine neden olur. Oluşan fibrin molekülleri

bakteri hücrelerinin etrafını sararak opsonizasyon ve fagositoza karşı dirençli hale getirir. Koagülaz testi, *S. aureus* için standart bir belirleyicidir [39].

2.5.3. Hiyaluronidaz

S. aureus izolatlarının % 90'ının ürettiği bir enzimdir. Hiyaluronidaz, hiyalüronik asitleri parçalar. Hücreler arası bölgede yer alan matriksi hidrolize eder. Böylece bakterinin hedef organizmada yayılması kolaylaşır [29,39].

2.5.4. Lipaz

S. aureus suşları çok farklı sayı ve çeşitte lipaz enzimleri üretir. Bu enzim lipidleri parçaladığı için bakterinin deri ve alt bölgerinde yayılması için ortam sağlar [39].

2.5.5. Deoksiribonükleaz (DNase)

S. aureus suşlarının % 90'dan fazlasında bulunan DNase termostabil bir enzimdir, endonükleaz ve ekzonükleaz aktivitesiyle nükleik asitleri 3'fosfomononükleotidlere parçalar [29,38,39].

2.5.6. Stafilokinaz (fibrinolizin)

S. aureus 'un geç üreme fazında üretilen stafilokinaz 136 aminoasitten oluşan ve 15,5 kDa ağırlığında bir enzimdir. Enzim üretimi bir faj genomu kontrolü altında veya kromozomal genler tarafından gerçekleştirilebilir. Stafilokinaz fibrin pıhtılarını çözerek enfeksiyonun dokularda daha kolay yayılmasını sağlar. Stafilokokların fibrinolitik etkisi kinazların, plazmada bulunan plazminojeni aktive ederek plazmine dönüştürmesi aracılığıyla oluşur. Stafilokinaz ayrıca bakteriyi fagositoza karşı korur [51].

2.5.7. Penisilinaz (β -laktamaz)

Penisilinin ilk kez 1941'de klinik anlamda kullanılmaya başlanmıştır. Stafilokok grubu bakteriler o yıllarda penisiline duyarlı iken günümüzde %90-92 oranında penisilinazlara karşı direnç geliştirmişlerdir [45]. Betalaktamaz enzimi penisilini, ayrıca sefalosporin ve

beta-laktam antibiyotikleri de parçalayarak, bu antibiyotiklere karşı direnç gelişimi tablosuna sebep olur. Beta-laktam antibiyotikler ile 3 sınıf protein reaksiyona girer.

1. Karboksi peptidazlar
2. Transpeptidazlar
3. Beta-laktamazlar(penisilinaz) [52].

Stafilokoklar, Gram pozitif bakteriler arasında penisilinaz üreten en önemli bakterilerdir. Stafilokokların ürettiği bu enzimleri kodlayan genler çeşitli genetik transport yollarıyla *S. epidermidis*'e taşınabilirler [53].

2.5.8. Slime faktör

Slime maddesi, amorf yapıda glikokaliks materyalleri olup %40 karbonhidrat, %27 proteinden oluşur. Slaym pozitif stafilokok suşlarının daha virülan olduğu ve antibiyotiklere daha dirençli oldukları bildirilmektedir. Slaym faktör, hücrel immun yanıtı baskılar, opsonizasyonu, nötrofil kemotaksisini ve nötrofil fagositozunu inhibe eder [29].

2.5.9. Fosfatid-spesifik fosfalipaz inositol C

Solunum zorluğu sendromuna sahip insanlardan izole edilen suşlarda bulunan bir enzimdir. Bu suşlar, penisiline karşı daha fazla dirençlidir [54].

2.5.10. Termostabil nükleaz (TNaz)

Tüm *S. aureus* suşları, RNA veya DNA'yı hidrolize edebilen bir termonükleaz enzim salgırlar. Bu enzim ısıya dayanıklıdır [55]. TNaz enzim aktivitesinin saptanabilmesi için, toluidin mavili DNA agar besiyeri kullanılır [56].

2.6. Toksinleri

S. aureus, beş sitolitik veya membran yıkımlayıcı toksin (alfa, beta, gama, delta ve Pantone-Valentine lökositidin (PVL)), 2 eksfoliyatif toksin (A ve B), 8 enterotoksin (A, B, C, D, E, G,

H ve I) ve toksik şok sendrom toksin (TSST)'i içeren çok sayıda virülans faktörü üretir. Sitotoksinlerin nötrofilleri parçalaması sonucu salınan lizozomal enzimler çevre dokuda yıkıma neden olur. Sitotoksinlerden biri ve PVL şiddetli pulmoner ve kutanöz enfeksiyonlarla ilişkilendirilmektedir. Eksfoliyatif toksin A, TSST ve enterotoksinler süper antijenler olarak bilinen polipeptidler sınıfına aittir [45].

2.6.1. Membran yıkımlayıcı toksinler

Hemolizinler

Alfa hemolizin (Alfa toksin)

Alfa toksin ilk kez 1900 yılında Kraus ve Clairmont tarafından tanımlanmıştır [29]. En fazla membran hasarına neden olan proteindir ve 33 kDa ağırlığındadır. *S. aureus*'ların temel hemolizindir. Kodlanma işlemi bakteriyel kromozomlar ve plazmidlerde gerçekleşir. Hemolitik aktivitesi tavşanlar için çok yüksektir. İnsan makrofaj, trombosit hücre membranları üzerinde yıkıcı etkiye sahipken, monositler üzerine etkisizdir. Konak hücre membranlarının hidrofobik bölgelerine etki ederek, 1-2 nm çapında porlar oluşturur. Oluşan bu porlardan kısa zaman içinde potasyum atımı, sodyum, kalsiyum ve diğer küçük moleküllerin alımına neden olarak hücrenin şişmesi ve parçalanmasına neden olmaktadır [57,58].

Beta hemolizin (Beta toksin)

Glenny ve Stevens tarafından 1935'te tanımlanmıştır. Alfa toksinle beraber farklı hücreler üzerine etkili olan bir sfingomyelinazdır. Moleküler ağırlığı 35 kDa'dır ve üreme fazının son evresinde üretilmeye başlar. Hemolitik aktivite gösterebilmesi için magnezyum iyonlarına ihtiyaç duyar ve sfingomyelin ve lizofosfatidilkolini substrat olarak kullanır. Sıcak-soğuk hemolizin olarak da tanınırlar. Bunun nedeni eritrositlerin soğuğa maruz kalmasıyla beta toksinin hemoliz etkisinde artış görülmesidir. Abse ve doku hasarı gibi invaziv stafilokok enfeksiyonlarının tipik belirtilerinin oluşumunda alfa toksin ile birlikte en önemli etkindir. CAMP faktörle sinerjik bir şekilde etkileşime girerek *S. aureus*'ta hemolizin etkisini artırır [38,39].

Delta hemolizin (Delta toksin)

Delta toksini 1947 yılında Williams ve Harper bildirmiştir. Antijenik değildir [29]. Termostabil yüzeyel etkinlik göstererek deterjanlara benzer bir etki ile hücre membranını bozmaktadır. *S. aureus* türlerinin %97'sinde bulunur. İnsan, tavşan, koyun ve maymun eritrositleri üzerinde etkilidir. Eritrositler, makrofajlar, lenfositler ve plateletler gibi geniş bir etki alanına sahip olup bunlar üzerinde litik etki yapar. Bunların yanında ileumda su absorpsiyonunu inhibe eder [43,58].

Gama hemolizin (Gama Toksin)

Smith ve Price 1938'de tanımlamıştır. İnsan, tavşan ve koyun eritrositleri bu toksine duyarlı iken, at ve kuş eritrositleri dirençlidir [29]. Özellikle stafilokoklara bağlı kemik infeksiyonlarında kanda, bu toksine karşı antikor düzeyinin yüksek bulunması, bu toksinin bu hastalıklarda etkili olduğunu düşündürmektedir [43].

Panton valentine lökositini (PVL)

Van de Velde 1894 yılında lökositleri parçalama özelliği nedeniyle “lökositin maddesi” olarak bu toksini tanımlamıştır [49,59]. Bundan 36 yıl sonra Panton ve Valentine isimli bilim insanları, bu sitotoksinin deri ve yumuşak doku infeksiyonları ile ilişkili olduğunu bilim dünyasına ispat etmişlerdir [60]. Bakteriyofaj ile bakteriye geçen PVL genin toksini antijenik olarak iki kısma sahiptir. Bunlardan elektroforetik olarak hızlı olan LukF, yavaş olan ise LukS'dir [29]. PVL'yi oluşturan LukS PV ve LukF PV granülositlerin zarında bir delik oluşturarak zarın yapısını bozar [61,62,63]. PVL hedef hücre zarında oluşturduğu por ile zincirleme bir reaksiyon başlatarak hedef hücrenin ölümüne ya da parçalanmasına neden olur [61].

Süperantijenler

Süperantijenler, monosit-makrofajlar üzerindeki MHC II (major histocompatibility complex class II) reseptörlerinin antijen bağlayan kısmının dışında bir bölgesine yüksek afinite ile bağlanır ve bu kompleks T lenfositlerinin bazı alt gruplarının üzerinde bulunan T hücre reseptörlerinin değişken V bölgesi tarafından nonspesifik olarak tanınır ve bu T

hücrelerinin tümünün aktivasyonuna neden olur. Normal bir antijen MHC II ile sadece kendisine spesifik T hücrelerini uyarırken, çok az miktardaki süperantijen, belli bir alt gruptaki T hücrelerinin tümünü antijen spesifikliğine bağlı olmadan uyararak aşırı sitokin salınımına neden olur ve sonuçta toksik sok sendromuna yol açar [64]. İnsan vücudunda çok az miktarda dahi süperantijen içeren *S.aureus* bulunması ölümcül olabilir [39].

Eksfoliyatif toksin

Stafilokoklar, veziküler deri infeksiyonlarına neden olabilirler. İşte bu infeksiyonlardan eksfoliyatif toksin sorumludur. Deride, Stafilokokal haşlanmış deri sendromuna ve büllöz impetigoya sebep olur. *S. aureus* suşlarının sadece % 0-2'si bu toksini üreten genleri taşır. Epidermolitik toksinler olarak da bilinirler ve eksfoliyatif toksin (ET) A ve B olmak üzere iki çeşidi mevcuttur. ET-A ve ET-B'nin immunolojik ve biyokimyasal özellikleri birbirinden farklı ancak biyolojik aktiviteleri benzerdir. ET-A kromozomal kökenli termostabil bir protein iken, ET-B ise plazmid kökenli ve ısıya duyarlıdır. ET-A ve ET-B hücre dışı olarak etki gösterir, direkt olarak hücre ölümüne, hücre membran lizisine veya inflamatuvar cevaba neden olmaz. Sadece üst epidermisin tutulumuyla karakterizedir. Bunun dışında herhangi bir organa veya hücreye de zarar vermez. Hedef molekülü desmoglein-1 adı verilen bir transmembran desmosomal glikoproteindir [39,65].

Enterotoksinler

Enzimlere, midedeki hidroklorik aside ve kaynayan suda 30 dakika bekletilmeye dayanıklı toksinlerdir. *S. aureus*'un sekiz farklı (A, B, C (C1- C3), D, E ve F) enterotoksini vardır. Bu toksinler süperantijen yapısındadır. F toksini olarak isimlendirilen bu toksinin özel adı "Toksik Şok Sendrom Toksini-1"dir [39,43]. A toksini olarak isimlendirilen toksin ise en çok gıda zehirlenmelrine neden olur. Kontamine süt ürünlerinde enterotoksin C ve D bulunmakta, enterotoksin B ise psödomembranöz enterokolite neden olmaktadır. Enterotoksinler makrofaj ve yardımcı T hücrelerinden IL-1 ve IL-2 salınımını uyararak sindirim sisteminde bir süper antijen gibi davranırlar. Zehirlenmenin en önemli belirtisi olan kusmanın mast hücrelerinden inflamatuvar mediyatörlerin salınımıyla alakalı olduğu düşünülmektedir. Et ve dondurma gibi besin maddelerinde bu toksinler oluşmuş ise ortalama 8 saate kadar kusma görülür. İnfeksiyon 1-2 gün ile sınırlı olup sadece destek tedavisi uygulanır. Bu enterotoksinler gıda zehirlenmelerinin yanında, otoimmün

hastalıklara, artrite, alerjik reaksiyonlara ve toksik şok benzeri bir tabloya neden olmaktadır [39,66,67].

Toksik şok sendromu toksini-1 (TSST-1)

Toksik Şok Sendromu Toksini (TSST-1) *S. aureus* suşlarının yaklaşık % 1'i tarafından oluşturulur. Bu toksini olan *tst* geni kodlar. Toksik şok sendromuna neden olan bu toksin süperantijen özelliğindedir ve yoğun sitokin üretimine neden olur. Toksik şokun klinik semptomları bu sitokin artışıyla ortaya çıkmaktadırlar [39]. Çok geniş bir biyolojik aktivitesi olan bu toksin, ateş, deri döküntüleri, hipotansiyon ve çoklu organ yetmezliği, kusma, diare ile giden toksik şok sendromuna yol açar. Aynı zamanda, kalp kası, iskelet sistemi, karaciğer ve böbrek dokusuna doğrudan toksik etkisi vardır [64]. Menstruasyonla ilişkili toksik şok sendromundan, *S. aureus* suşlarının % 90'nı sorumludur. TSS'li hastalarda ölüm, hipovolemik şok nedeniyle gelişen multiorgan yetmezliğinin sonucudur [68].

2.7. Epidemiyoloji

S. aureus doğumdan itibaren göbekte, perinede ve deride daha sonraki yıllarda ise özellikle burunda kolonize olur. Doğurgan çağıdaki kadınların yaklaşık %10'unun genital sisteminde *S. aureus* bulunur ve bu oran menstruasyon döneminde arttığı saptanmıştır. Rektal ve perineal taşıyıcılık da söz konusudur. İnsülin enjeksiyonu olan diabet hastaları, kronik hemodiyaliz hastaları, kronik dermatolojik hastalıkları olanlar ve HIV pozitif kişilerde taşıyıcılık oranları normalin üzerindedir. Stafilokoklar, deri ve nazofarinkste bulunurlar dolayısıyla yayılmaları kolaydır ve birçok hastane kaynaklı enfeksiyona neden olurlar. Stafilokoklar kuru yüzeylerde uzun süre canlılıklarını sürdürebilirler fakat yüksek ısı, dezenfektanlar ve antiseptik solüsyonlara duyarlıdırlar. Bulaş, duyarlı kişilere direkt temas ve kontamine materyallerle gerçekleşmektedir. Nazal *S. aureus* taşıyıcılığının prevalansı popülasyona göre farklılık göstermektedir ve yaş, ırk, antibiyotik kullanımı, hastaneye yatış durumu gibi birçok faktöre bağlıdır. *S. aureus*'un nazal taşıyıcılığı; devamlı nazal taşıyıcılık (yaklaşık %20), aralıklı nazal taşıyıcılık (yaklaşık %60) ve hiç taşımayanlar (yaklaşık %20) olmak üzere üç tip şeklinde tanımlanmaktadır. Hastane personelinde ise taşıyıcılık oranı %50-90'lara kadar ulaşabilmektedir [68,69,70].

2.8. *Staphylococcus aureus*'un Neden Olduğu Hastalıklar

S.aureus 'un insan vücudunda enfeksiyon yapmasını; kişinin vücuna giren bakteri sayısı ile patojenitesi, kişinin bağışıklık mekanizmaları, deri ve mukoza bütünlüğü etkiler.

Stafilokoklar insanlarda yüzeysel deri ve mukoza enfeksiyonlarından, ciddi sistemik enfeksiyonlara kadar değişen çok çeşitli hastalıkların etkenidirler. Çizelge 2.4 de *S.aureus* 'un neden olduğu enfeksiyonlar gösterilmiştir. Deri enfeksiyonlarında *S. aureus*, kıl kökü, ter ve yağ bezlerini giriş kapısı olarak kullanır. İnsan hayatını tehdit eden çeşitli stafilokok enfeksiyonları vardır. Bunlar arasında sepsis, endokardit ve stafilokoksik bakteriyemi yer alır. *S.aureus* kaynaklı bir enfeksiyon oluşma ihtimalini arttıran nedenler arasında; konağa ait deri bütünlüğünde bozulma, kronik rahatsızlıklar, virüs kaynaklı enfeksiyonlar, aşırı antibiyotik kullanımı ve hücre içi imha sistemlerindeki problemler bulunmaktadır [29, 71].

Çizelge 2.4. *S.aureus* un neden olduğu enfeksiyonlar [74]

Taşıyıcılık	Burun, nazofarenks, deri, vajen, aksilla, perine vs.
Cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları	Folikülit, fronkül, karbonkül, impetigo, Yara enfeksiyonları (travmatik veya cerrahi) Sellülit, Mastit
Bakteriyemi	Artrit, osteomyelit, menenjit, endokardit, perikardit, akciğer apsesi vs
Metastatik enfeksiyon	Metastatik enfeksiyonlar Vaskulit ve koagülopati Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu, çoğul organ yetmezliği
Santral sinir sistemi enfeksiyonları	Beyin apsesi Menenjit Epidural apse
Pulmoner enfeksiyonlar	Nozokomiyal pnömoniler Ampiyem
Kas-iskelet sistemi enfeksiyonları	Artirit Osteomyelit Piyomiyozit
Genito-üriner sistem enfeksiyonları	Prostatik materyal enfeksiyonları Üst üriner sistem enfeksiyonları Alt üriner sistem enfeksiyonları
Toksinle ilişkili hastalıklar	Besin zehirlenmesi Toksik şok sendromu Soyulmuş deri sendromu
Yabancı cisim enfeksiyonları	İntravenöz kateter Üriner kateter Periton diyaliz kateteri Santral sinir sistemi şantları Prostatik kalp kapakları Kalp pili, elektrod ve telleri

2.8.1. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları

İmpetigo

Özellikle yüz ve ekstremiteler olmak üzere vücudun dışı açık kalan bölümlerinde görülen yüzeysel bir enfeksiyondur. Daha çok 2-5 yaş arası çocuklarda görülür. Etken %80-90 oranında *S. aureus* 'dur. *S. aureus* suşları büllöz impetigo oluşmasına sebep olur. Sağlam bir ciltte bulunan etken, sıyrık, küçük travma veya böcek ısırıkları ile epidermisin bütünlüğünün bozulmasını takiben cilt içerisine inoküle olur ve enfeksiyon sürecini başlar. Hastalık genellikle sırasıyla küçük kırmızı bir makül, vezikül, püstül ve sonunda da 4-6 gün içerisinde kalın karakteristik kabuk yapının gelişmesiyle karakterizedir. Oluşan bu kabukların etrafında eritemlerde gözlenir [33,39].

Folikülit

Kıl köklerinde görülen sınırlı, küçük, kırmızı, ağrılı piyogenik enfeksiyonlardır. Lokal antiseptikler ile tedavi mümkündür [33,39].

Fronkül

Folikülitlerin birleşmesiyle oluşan sıcak, ağrılı, 1-2 cm çapında endüre lezyonların görüldüğü küçük apselerdir. Fronküller ilerleyerek apseye veya selülite neden olabilir. Burun ve üst dudak çevresinde olduklarında yaşamı tehdit eden kafa içi septik tromboflebitlere neden olabilir [33,39,72].

Karbonkül

Fronküllerin birleşmesi ve enfeksiyonun subkutan dokulara yayılmasıyla oluşan enfeksiyonlardır. Tutulum boyun bölgesinde yoğundur. Ateş, titreme gibi sistemik semptomlar eşlik edebilir. Bakteriyemiye yol açabilir. Karbonküller için insizyon ve drenaj tedavisinin yanında parenteral antibiyotik kullanımına da ihtiyaç duyulabilir [33,39,72].

Apse

Apse, dermis ve daha derin cilt altı dokularda irin birikmesidir. Genellikle ağrılı ve hassas, üzerinde bir püstülün görülmesiyle karakterize etrafı kırmızı şişliklerdir. *S. aureus* tüm cilt apselerinin %25'inden sorumludur [72].

Cerrahi yara enfeksiyonları

Cerrahi işlem veya travma sonrası birkaç gün içerisinde ilerleyici şişlik, eritem ve yara etrafında ciddi ağrı ile kendini gösteren enfeksiyonlardır. Hastane enfeksiyonları önleme merkezinin verilerine göre operasyon geçiren hastaların %2,6'sında cerrahi yara yeri enfeksiyonları gelişmektedir. Surveyans sistemindeki yetersizliklerden dolayı bu oran gerçekte var olandan çok daha azdır. *S. aureus* ile burun taşıyıcılığı operasyon geçiren bireylerde önemli bir risk faktörüdür. Yine operasyon bölgesinin yetersiz kan dolaşımına sahip olması veya kan dolaşımını etkileyen ek hastalık durumları cerrahi yara enfeksiyonu riskini artırır [30,46].

Erizipel ve selülit

Erizipel; yüzeysel lenfatikler de dâhil olmak üzere dermisin daha üst tabakasının tutulumudur. Selülit ise cilt altı yağ dokusu da dahil dermisin daha alt tabakasının tutulumu olarak değerlendirilir. *S. aureus*'a bağlı erizipel çok sık değildir genellikle beta hemolitik streptokoklar tarafından oluşturulur. *S. aureus* daha nadiren selülitte neden olur. Hastalarda sıklıkla öncesinde penetran bir travma öyküsü veya yasa dışı ilaç kullanımına bağlı enjeksiyon yerleri mevcuttur [30,72].

Hidradenitis süpürativa

Apokrin ter bezlerinin irinli enfeksiyonudur. Koltuk altı, perine ve genital bölgede görülür. Kendiliğinden iyileşebilir [32].

Mastisit

Emziren annelerde, doğumdan sonra 2. ya da 3. haftalarda görülür. Ağrılı nodülleri vardır [32].

2.8.2. Toksinlere bağlı olarak ortaya çıkan enfeksiyonlar

Stafilokokal haşlanmış deri sendromu

Ritter hastalığı olarak da bilinir. *S. aureus*'un eksfoliyatif toksinleri bu hastalığa neden olur ve önce ağız çevresinde eritemle ani başlar sonrasında ise tüm vücuda yayılır. Hafif dokunmayla dahi deride soyulmalar gözlenir. Bir sonraki aşama ise büyük büller ve kutanöz kabarcıkların oluşmasıdır. Toksinin hematojen yayılımı yaygınlaşırsa ateş görülebilir. Genellikle yenidoğanlar ve bir yaş altı bebekler etkilenir. Mortalite oranı yaklaşık %5'tir [46,66].

Toksik şok sendrom

Toksik şok sendromu ilk kez 1978 yılında Todd ve arkadaşları tarafından mukozal yüzeylerde toksin üreten *S. aureus* izole elde edilerek bildirilmiştir [57]. Menstrual ve non-menstrual toksik şok sendromu olmak üzere iki klinik şekilde meydana gelmektedir [46]. Menstruasyon sırasında tampon kullanan kadınlarda görülen bir tablodur. Vakaların yarısından toksik şok sendromu toksini-1 (TSST-1) üreten *S. aureus* bakterileri sorumludur. En belirgin semptomlar şiddetli miyalji, ateş, kusma ve ishaldir. Tedavide serumla elektrolit kaybının giderilmesi çok önemlidir [46,65].

Stafilokokal besin zehirlenmesi

Hastalık *S. aureus*'un toksiniyle kontamine olmuş gıdaların yenilmesi ile oluşmaktadır. Kontamine gıdalarda görüntü, tat ve koku normaldir. Gıdanın ısıtılması ile bakteriler ölse de toksinler ısıya dirençli olduğundan inaktive olmazlar. Karın ağrısı ve bulantı görülebilir. Ateş ve nörolojik bulgu gözlenmez. Tedavide sıvı-elektrolit replasmanı esastır. Antibiyotik tedavisine ihtiyaç yoktur [46,65,73].

2.8.3. Stafilokokların invazyonu ile oluşan enfeksiyonlar

Bakteriyemi

Stafilokokların neden olduğu bakteriyemiler hastane kökenli veya toplum kökenli olabilir. Hastane kökenli MRSA bakteriyemiler daha çok kateterlerden ve diğer invaziv girişimlerden kaynaklanır ve mortalite oranı yaklaşık %80'dir. Toplum kökenli stafilokokal bakteriyemilerin genellikle selülit, osteomyelit, endokardit ve pnömoni gibi altta yatan bir nedeni vardır [32,73].

Endokardit

Stafilokoklar tüm endokardit vakalarının %20-30'undan sorumludur. *S.aureus* kaynaklı yavaş başlayan hızlı ilerleyen endokardittir. Ateş ve metastatik apselerle seyreder. En çok mitral ve aort kapakları tutulur. Mortalite %40'lara ulaşabilir [74].

Menenjit

Lokal enfeksiyonlardan komşuluk yoluyla ya da sepsis ve endokardit sonrası hematogen yolla ortaya çıkar. *S.aureus* , toplumdaki kazanılmış menenjitlerin %2.4'ünün sebebidir fakat bu menenjitlere bağlı ölüm hızı %43'tür. Olguların %57'de endokardit vardır [64].

2.8.4. Solunum Sistemi Enfeksiyonları

Pnömoni

Staphylococcus aureus kaynaklı pnömoniler daha çok influenza gibi viral alt solunum yolu enfeksiyonlarından sonra görülür. Oral sekresyonların aspirasyonu veya vücudun diğer bölgelerinden hematogen yayılım *S. aureus* pnömonisine neden olmaktadır. Aspirasyon pnömonileri genellikle bebekler, yaşlılar ve kistik fibrozisliler, KOAH' lılar ve bronşiektazililerde görülürken; hematogen pnömoni ise daha çok bakteriyemi veya endokarditi olan hastalarda görülmektedir. Toplumdan kazanılmış MRSA suşları yoğun hemoptizi, septik şok ve yüksek mortaliteye sahip nekrotizan pnömoniye sebep olmaktadır [66,73].

Ampiyem

Staphylococcus aureus plevral ampiyemin en sık görülen etkenidir. Teşhis, plevral sıvının laboratuarda incelenmesiyle konulur. *S. aureus* ampiyemlerinde plevra sıvısı bulanık, koyu ve kokusuzdur [66,73].

2.8.5. Kemik ve eklem enfeksiyonları

Osteomyelit

Staphylococcus aureus akut osteomyelitin en sık neden olan etkindir ve sıklıkla 12 yaş altında çok görülür. Yenidoğanda göbek kordonu enfeksiyonu sonrası alt ekstremiteleri tutar. Uzun kemiklerin metafiz bölgesinde ağrı ve yüksek ateş ile ortaya çıkar. Erişkinlerde en çok omurgayı etkiler [73].

Septik artrit

Septik artrit, vücuttaki herhangi bir yerde bir hasar ya da cerrahi müdahale sonrasında ortaya çıkabilir. En sık sebebi *S. aureus* 'tur. Daha çok eklemleri tutar. Eklemlerde şiş, sıcak, ağrı vardır. Teşhis eklem aspire sıvının incelenmesi ile konulur [73].

Septik bursit

Septik bursit vakalarının %90'ında etken *S. aureus* 'tur. Diz ve dirsek eklemleri en sık tutulan yerlerdir. Tutulan eklem üzerindeki deri sıcak, ödemli ve parlak görünümlüdür. Eklem hareketinde kısıtlılık hikâyesi yoktur [73].

2.8.6. Üriner sistem enfeksiyonları

S. aureus iki yolla üriner sistem enfeksiyonlarına neden olur; bakteriyemi esnasında renal kortekse yerleşerek, renal kortikal apse veya karbonküle yol açar, ikinci olarak da kalıcı üriner kateteri olanlarda enfeksiyona yol açabilir [74].

2.9. *S.aureus* 'un Laboratuvar Tanısı

Laboratuvar tanısında şüpheli numunenin ekimi ve üremesi sonrasında gözle inceleme yapılır. Ardından mikroskop ile bu kolonilerden örnek alınarak incelenir. Ayrıca katalaz, koagülaz aktivitesi de yol göstericidir. Bakterinin identifikasyonu yapılırken koloni morfolojisi, gram boyama, hemoliz, pigment üretimi, mannitol fermantasyonu, yüksek tuz konsantrasyonlu ortamda üreme gibi özellikleri göz önünde bulundurulmalıdır. *S. aureus*'un bütün suşları koagülaz pozitifdir ve mannitolü fermente ederler.

2.9.1. Gram boyama ve mikroskopik inceleme

Klinik bir örnekten alınan numune gram boyama yöntemi ile boyanır. Boyama sonucu gram pozitif koklar tek tek, çiftler, zincirler veya kümeler şeklinde görülebilir. [75].

2.9.2. Kültür

Stafilokoklar, birçok besiyerinde üreyebilmektedir. Günümüzde daha çok kanlı agar besiyeri kullanılır. Stafilokoklar 24 saat inkübasyon sonucu ürerler. Bir besiyerinde yapılan ekim sonucu kontaminasyondan şüpheleniliyorsa Gram negatif bakterilerin üremesini engelleyen besiyerleri(mannitol salt agar, feniletıl alkol agar) kullanılabilir. Ayrıca *S. aureus*'un selektif izolasyonu isteniyorsa %7,5 sodyum klorid içeren agarlı besiyeri de kullanılabilir. Stafilokok kolonileri genellikle düz, yağlı görünümde ve hafif tümsek olmakla birlikte, bazı *S. aureus* kolonileri nemli veya yapışkan olabilirler. Bazı suşlar sarı veya sarı-turuncu renkliken, bazıları da beyaz ya da gri renklidir [39,43].

2.9.3. Katalaz testi

Stafilokoklar, katalaz pozitifdir. Streptokoklar ise katalaz negatif olmalarından dolayı stafilokoklardan ayrılırlar. Katalaz testinde incelenecek koloni öze ile bir lam üzerine alınır. Bunun üzerine hidrojen peroksit (H_2O_2) damlatılır. Kolonide katalaz enzimi varsa hidrojen peroksit su ve oksijen gazına ayrılacağı için kabarcıklar oluşacaktır [29].

2.9.4. Koagülaz testi

Koagülaz testi, *S. aureus*'un diğer stafilokok türlerinden ayrımında kullanılan yöntemdir. Koagülaz enzimi, fibrinojenin fibrine dönüşümünü uyararak plazmanın pıhtılaşmasına neden olur. Tüpte ve lamda olmak üzere iki şekilde yapılabilmektedir. Her iki test için de EDTA'lı tavşan plazması önerilmekle beraber, insan plazması da kullanılabilir [39,55].

Lamda koagülaz testi (Bağlı koagülaz)

Temiz bir lama iki damla saf su damlatıldıktan sonra koloniler öze ile alınıp bu iki damlaya homojen şekilde yayılır. Daha sonra bu damlaların birine plazma, diğerine de negatif kontrol amacıyla tuzlu su damlatılarak öze ile karıştırılır. Pozitif olan sonuçlarda hücreye bağlı "clumping" faktör nedeniyle 10-30 saniye içinde gözle görülür bir kümeleşme oluşur. Yüksek tuz oranını otoaglutinasyona neden olabileceğinden mannitol salt agardan alınan koloniler ile koagülaz testi yapılmamalıdır. Negatif bulunan her kökende serbest koagülaz enziminin araştırılması için tüp aglutinasyon testi yapılması gerekir [39].

Tüpte koagülaz testi (Serbest koagülaz)

Plazma serum fizyolojik ile sulandırılır. %20 oranında sulandırılan plazmaya stafilokok örneklerimiz karıştırılır. Karıştırma işlemi sonrası testimiz 35°C'lik etüve kaldırılır ve her saat başında pıhtı oluşumu gözlenir. Dört saat sonunda pıhtı oluşumu varsa pozitif sonuç kabul edilir. Pıhtılaşmanın nedeni hücre dışına salgılanıp, plazmadaki CRF ile birleşerek trombokinaza benzeyen bir etki ile fibrinojeni fibrine çeviren koagülaz enzimidir. Sitrata metabolize eden bazı mikroorganizmaların yalancı pozitif sonuç verebilmesi sebebiyle sitratlı serum kullanılması uygun değildir. *S. aureus*'un hem lamda, hem de tüpte koagülaz deney sonucu pozitifdir [39,49].

Alternatif koagülaz test yöntemleri (Lateks aglutinasyon)

Plazmayla kaplanmış lateks parçacıkları kullanılarak latekse bağlı fibrinojenin clumping faktörle etkileşmesini sağlamak için yapılır. Ayrıca lateks parçalarında bulunan immunglobulin molekülleri sayesinde *S. aureus*'un hücre duvarı proteini olan protein A da

tespit edilebilmektedir. Örnek kolonilerin test materyali ile karışması sonucu, lateks-mikroorganizma süspansiyonu hızlı bir kümeleşme göstermektedir. *S. lugdunensis* ve *S. schleiferi*'nin bazı suşlarının da clumping faktör üretip, bu test ile pozitif reaksiyon verebildiği test sonuçlarını değerlendirirken göz önünde bulundurulmalıdır [39].

2.9.5. Deoksiribonükleaz (DNaz) testi

Stafilokoklar, katalaz pozitifdir. *S.aureus* ise hem katalaz hem de koagülaz pozitifdir. Bazı Stafilokok grubu bakteriler ise katalaz pozitif koagülaz negatiftir. İşte bu tip bakterileri *S.aureus* 'dan ayırabilmek için bu test kullanılır. DNaz testi için kullanılan besiyeri DNA içerir. Şüpheli koloni *S.aureus* ise bu bakteriler DNase enzimi içerdiği besiyerindeki DNA'yı parçalayacaklardır. Üreyen kolonilerin üzerine 1 N hidroklorik asit damlatılır. Bu asit DNA'yı çökeltir ve *S.aureus* bakterisinin etrafında şeffaf bir bölge oluşur. Diğer bölgelerde DNA olduğu için bulanık görülecektir. Bu teste toluidin mavisi eklersek şeffaf bölgeler pembe görülecektir [76].

2.9.6. Termotabil endonükleaz testi

DNaz besiyerine 3 mm steril bir cam boru batırılıp kesilerek kuyucuklar açılır. Beyin-kalp buyyonda 24 saat üremiş organizmalar 15 dakika kaynar su banyosuna tutulur. Oda ısısında soğutulur. Pipet ile besiyerindeki kuyucuklara doldurularak 35°C de 1 gece inkübe edilir. *S. aureus* türleri kuyucukların etrafında pembe bir zon oluştururken diğer stafilokoklar renk değişikliği gözlenmez [39].

2.9.7. Mannitol fermentasyonu

Mannitol fermentasyonu, *S. aureus*'u diğer stafilokoklardan ayırt etmede koagülaz testinden sonra en yararlı testtir. *S. aureus* mannitolü daima kullandığından karışık bakteri florası içeren materyalden stafilokokların ayırımı için kullanılmaktadır. Bu test için mannitollu tuzlu agar kullanılır. Tuz içerisinde *S.aureus* üremeye devam edebilir. Fakat diğer bakteriler üreyemez. Bu besiyerinde üretilen *S. aureus* kolonilerinin etrafında 48 saatte sarı zon, *S.epidermidis* kolonilerinin etrafında kırmızı zon meydana geldiği gözlenir. *S. aureus*, mannitolü fermente ederek, besiyerinin içerdiği fenol kırmızısının rengini sarıya çevirir [49].

2.9.8. Protein A saptanması

Protein A Saptama yöntemi, lam koagülaz testine bir alternatiftir. Protein A, IgG'nin Fc kolu için spesifik afiniteye sahiptir. Protein A'yı saptamak için ticari olarak bulunan insan fibrinojen ve IgG'si ile kaplı polistren lateks partikülleri içeren ayıraçtan reaksiyon kartına bir damla damlatılır. Stafilokok kolonisi uygulama çubuğu ile karıştırılır, aglütinasyon oluşursa sonuç pozitifdir. Protein A testi *S. aureus* ile pozitif, *Staphylococcus epidermidis* ile negatif sonuç verir [49].

2.9.9. Metisilin direncinin belirlenmesi (Oksakilin direnç testleri)

Staphylococcus aureus suşlarının identifikasyonunun ardından metisiline (ya da oksasiline) olan direnci belirlemek amacıyla genellikle Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemle metisilin direncini belirlemek için daha önceleri oksasilin diski önerilmekte iken, son yıllarda sefamisin türevi sefoksitin diski daha stabil olması nedeniyle önerilmektedir. Metisilin direncinin tespiti için Mueller-Hinton agara inoküle edilen bakterilerin üzerine 30-µg sefoksitin diski yerleştirilerek 35°C'de 24 saat inkübe edilir. Disk çevresi zon çapı ölçülür. *S. aureus* suşları için European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) kriterlerine göre zon çapının 22 milimetreden küçük olması metisiline direnç, 22 milimetreden büyük veya bu değere eşit olması ise metisiline duyarlılık olarak değerlendirilir [77,78].

2.9.10. Moleküler yöntemler

Staphylococcus aureus izolatları koagülaz, diğer biyokimyasal testler ve oksasilin duyarlılık testlerinde şüpheli sonuçlar verebilir. Bu gibi durumlarda alternatif metotlar kullanılarak tanı doğrulamaya çalışılır. Polimeraz Zincir Reaksiyonunu prensibince çalışan tanı için oksasilin direncini saptamaya yönelik moleküler yöntemler bulunmaktadır. Bu yöntemlerle *S. aureus*'un tanımlanmasında sorumlu olan genlerden (nuc), (coa), (spA) ve metisiline dirençli *S. aureus*'un tanısına yönelik mecA geninin varlığı araştırılarak tanı konmaktadır [39].

2.9.11. Otomatize cihaz sistemleri

Stafilokokların tanısında API Staph (BioMerieux- Vitek), Minitek Gram pozitif panel (BD Microbiology System), ID 32 Staph (BioMerieux), Rapidec taph (BioMerieux-Vitek), Vitek1 (BioMerieux), Vitek 2 sistem (BioMerieux) ve BD Phoenix (Becton Dickinson) gibi otomatize cihaz sistemleri de kullanılmaktadır [55].

2.10. *S. aureus* Tedavisinde Kullanılan Antibiyotikler

Tedavide kullanılan antibiyotikler, stafilokokları öldürerek yayılmalarına engel olurlar [29]. Bu antibiyotikler hücre duvarı, protein ve nükleik asitlerin sentezini inhibe ederek iş görürler ve buna göre 3 gruba ayrılırlar.

- Hücre duvarı sentez inhibitörleri
- Protein sentez inhibitörleri
- Nükleik asit sentezi inhibitörleri olmak üzere üç grupta incelenebilir.

Bu grup antibiyotiklerden en uygun olanı, antibiyotik duyarlılık testleri ile belirlenmelidir.

Çizelge 2.5. Stafilokok infeksiyonlarının tedavisinde kullanılabilecek antibiyotiklerin gruplandırılması

Hücre Duvar Sentez İnhibitörleri	Protein Sentez İnhibitörleri	Nükleik Asit Sentez İnhibitörleri
1. Beta-laktam Antibiyotikler a. Penisilinler b. Sefalosporinler c. Karbapenemler	1. Aminoglikozidler 2. Makrolidler 3. Linezolid 4. Streptograminler 5. Linkozamidler 6. Kloramfenikol	1. Sülfonamidler ve Trimetoprim 2. Kinolonlar 3. Rifampin
2. Glikopeptidler		

2.10.1. Hücre duvarı sentez inhibitörleri

Penisilin G

Tüm penisilinlerin temel yapısı 6-aminopenisilininik asitten oluşur. Bu penisilinler doğal penisilinler grubundadır. Bu grup antibiyotikler hücre duvarı sentezini inhibe ederler [79].

Stafilokok infeksiyonlarında tercih edilmemelidir çünkü Stafilakokların %90'ı penisilinaz üretmektedir. [80].

Oksasilin

Metisilin, nafsilin, kloksasilin ve flukloksasilin ile beraber penisilinaza dirençli penisilinler grubun üyeleridir. Stafilokokların metilsilin direnç profillerini anlamak için oksasilin duyarlılıkları değerlendirilebilir.

Penisilinaz üreterek penisilinlere direnç geliştiren bakterilerin hücre duvarı sentezini inhibe etmek yoluyla etkilerini gösterirler [79]. Özellikle, metisiline duyarlı stafilokoklar ve streptokokların neden olduğu infeksiyonların tedavisinde kullanılırlar [79].

Amoksisilin/klavulanik asit

Amoksisilin ve klavulanik asitin kombinasyonundan oluşur. β -laktamazlarla parçalanmanın önlenmesi için β -laktam antimikrobikler, β -laktamaz inhibitörleri ile kombine edilirler [81]. Bu kombinasyon, bakterilerin hücre duvarında yer alan transpeptidaz ve karboksipeptidaz enzimlerine bağlanarak hücre duvarı sentezini durdurur [79]. Klavulanik asit, amoksisiline eklenerek bir kombinasyon elde edilir. Elde edilen bu kombinasyon β -laktamaz üreten *S. aureus*'a karşı etkindir [82].

Ampisilin/sulbaktam

Ampisilin, amoksisilin ile birlikte aminopenisilinler grubunu oluşturur. Ampisilin, β -laktamaz etkisini yok edebilmek için sulbaktam ile kombine halde kullanılır [83]. β -laktam ajanlar, hücre duvar sentezinin transpeptidasyon basmağında görev alan transpeptidaz ve karboksipeptidazlara bağlanarak etkilerini gösterirler [80].

Sefoksitin

Sefoksitin sefalosporinlerin ikinci kuşağının bir grubu olan sefamisinlerin bir üyesidir ve β -laktam halka yapısı içerir. Bakteri hücre membranındaki PBP'lere bağlanarak bakteri hücre duvarı sentezini inhibe ederler. Etki spektrumları, β -laktamazlara daha dayanıklı

olduklarından daha geniştir. *S. aureus*, *S. Pyogenes*, *S. Pneumoniae*, gram pozitif ve gram negatif koklara karşı etkilidirler [84].

Vankomisin

Vankomisin, dar spektrumlu bir antibiyotiktir. Metisilinden iki yıl önce 1958'de klinik kullanıma girmiştir ve glikopeptidlerin ilk üyesidir [85].

Vankomisin bakterisidal etki gösterir. Bakteride peptid yan zincirin ucundaki asil-Dalanin-D-alanin'e bağlanarak peptidoglikan zincirin biyosentezini bozar. Böylece hücre duvarı sentezini bozar. Vankomisin, stafilokok ve streptokok infeksiyonları, psödomembranöz enterokolit ve difteroidlerin neden olduğu infeksiyonlarda kullanılabilir [86].

Teikoplanin

Vankomisinden daha lipofilik özellikte ve glikoprotein yapıda bir antibiyotiktir. 1984 yılında, Avrupa'da klinik kullanıma girmiştir [87].

Teikoplanin tıpkı vankomisin gibi bakteri hücre duvar sentezinin engellenmesi ile iş görür. Bu antibiyotik metisiline dirençli *S. aureus* ve *S.epidermidis* gibi Gram pozitif bakterilerin neden olduğu sepsis, endokardit, pnömoni, yumuşak doku infeksiyonu ve osteomyelit gibi hastalıklarda kullanılır. Yan etkileri vankomisine göre daha azdır. Günde tek doz kullanılmasından dolayı uygulanabilme avantajı vardır [88].

Fosfomisin

İlk olarak 1969'da İspanya'da *Streptomyces* türlerinin kültürlerden elde edilmiştir. Fosfomisin hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere etkilidir. Fosfomisin, N-asetilmuramik asidin oluşumunu engelleyerek peptidoglikan sentezini inhibe eder. Ayrıca fosfomisin bakteri fimbrialarının sentezini ve hareket yeteneğini azaltarak patojenlerin üriner sistem epiteline ve üriner kateterlerinin iç yüzeyine yapışmasını ve kolonizasyonunu engeller [89].

2.10.2. Protein sentez inhibitörleri

Eritromisin

Streptomyces erytreus'tan 1952 yılında elde edilen eritromisin, makrolid grubu antibiyotiklerin ilk üyesidir. Makrolidler bakteri ribozomlarının 50S alt ünitesinin 23S rRNA birimine bağlanıp peptidil-tRNA translokasyonunu engelleyerek protein sentezini geri dönüşümlü olarak inhibe ederler [90].

Klindamisin

Klindamisin, linkozamidler grubunun bir üyesidir. 1962 yılında *Streptomyces lincolnensis*'ten elde edilip kullanıma sunulmuştur. Linkozamidler bakteri ribozomunun 50S alt birimine bağlanarak peptidiltransferaz reaksiyonunu inhibe eder ve protein sentezini önlerler.

Metisiline dirençli stafilokoklar ile hastane kökenli stafilokoklar için direnç %12-34 olduğundan klinik kullanımda mutlaka duyarlılık testleri yapılmalıdır [91].

Tetrasiklin

Ribozomların 30S alt birimine bağlanıp 50S alt biriminine aminoasil tRNA'nın bağlanmasını önler ve bu yolla protein sentezini inhibe ederek bakteriyostatik etki oluştururlar [92].

Geniş spektrumlu antibiyotiklerdir.

Gentamisin

Gentamisin aminoglikozid grubu protein sentezine etki ederek bakterisidal etki gösteren bir antibiyotiktir. Aminoglikozidler bakteri ribozomlarının 30S alt birimine geri dönüşümsüz bir şekilde bağlanarak protein sentezini inhibe ederler. İnhibisyon protein sentezinin başlamasının engellenmesi ve mRNA üzerindeki kodların yanlış okunması nedeni ile yapıları bozulmuş, bir işlevi olmayan anormal proteinlerin sentez edilmesi sonucunda iki

şekilde gerçekleştirilir. *S. aureus* ve *S. epidermidis* gibi Gram pozitif koklar aminoglikozidlere duyarlıdır [93].

Nitrofurantoin

Klinik kullanıma 1953 yılında giren nitrofurantoin sentetik bir nitrofuran türevidir. Nitrofurantoin'in en büyük gücü, birden çok yerde ve seviyedeki faaliyetidir. Bu, karbonhidrat sentezinde ve bakteriyel ribozomal proteinlere spesifik olmayan saldırı ile yüksek konsantrasyonda DNA, RNA ve toplam protein sentezinde yer alan bakteri enzimlerinin inhibisyonunu içerir. Nitrofurantoin, geniş spektrumlu bir bakterisit antibiyotiktir ve *Staphylococcus aureus*'un neden olduğu idrar yolu enfeksiyonlarını tedavi etmek için etkili bir şekilde kullanılır [94].

Linezolid

Linezolid, oksazolidinon sınıfına dâhil, sentetik yapıda antibakteriyel bir ilaçtır. Etkisini protein sentezini translasyon aşamasında inhibe ederek gösterir. Linezolid aynı zamanda virülans faktörlerinin ekspresyonunu ve Gram pozitif patojenlerde toksin üretimini azaltır [95].

Mupirosin

Dünyada 1985, ülkemizde ise 1991 yılında kullanılmaya başlayan Mupirosin (Pseudomonik asit A), *Pseudomonas fluorescens*'in fermentasyon ürünü olarak elde edilmiştir [96]. Mupirosin etkisini izölösil-tRNA sentetaza bağlanıp protein sentezini bozmak suretiyle bakteriyostatik olarak göstermektedir. Mupirosinin yarılanma süresi 30 dakikadan az olduğundan kanda hızla metabolize olur. Hızlı ve kapsamlı sistemik etkileri nedeni ile sadece topikal olarak uygulanır. Mupirosin, stafilokok ve streptokokların (Grup D streptokoklar hariç) neden olduğu deri ve yara enfeksiyonlarının tedavisinde, MRSA'larda nazofarengeal taşıyıcılığın ve kolonizasyonunun önlenmesinde özellikle bu yönden riskli yetişkin hastalar ve sağlık çalışanlarında kullanılmaktadır. Mupirosinin derinin normal florasını oluşturan mikroorganizmalara etki göstermemesi, savunma sisteminin bozulmaması yönünden önemlidir [96].

Tigesiklin

Tigesiklin, minosiklinin 9-t-butilglisilamido sentetik türevi olup yeni jenerasyon antibiyotik olan glisilsiklin grubunda yer almaktadır.

Tigesiklin, geri dönüşümlü olarak 30S ribozomal alt birimine bağlanır ve protein sentezini inhibe ederek bakteriyostatik etki gösterir [97].

Fusidik Asit

Avrupa’da 1962 yılında, ülkemizde ise 1998’de klinik kullanıma giren fusidik asit *Fusidium coccineum* mantarından elde edilen steroid benzeri yapıda fusidan sınıfından bir antibiyotiktir. Ribozomlara bağlanmadan bakterinin protein sentez mekanizmalarını bozarak etkisini gösterir. MRSA suşlarına etkili olması, glikopeptid grubu antibiyotiklere oral kullanım üstünlüğü ve ucuz maliyeti nedeniyle tedaviye alternatif olabilecek bir antibiyotiktir.

Akut ve kronik enfeksiyonlarda tek başına kullanıldığında yüksek oranda direnç geliştiğinden osteomyelit, endokardit gibi ciddi enfeksiyonlarda diğer antistafilokoksik antibiyotiklerle kombine edilerek kullanılması önerilmektedir [98,99].

2.10.3. Nükleik asit sentezini inhibe edenler

Siprofloksasin

Kullanıma 1987 yılında giren siprofiloksosin florlanmış kinolonlar, 4-kinolonlar, kinolon karboksilik asitler de denilen 2. kuşak bir kinolondur. Diğer kinolonlar gibi topoizomerazlara etki göstererek DNA sentezini inhibe ederler. Bakterisidaldirler. Gram negatiflerde ilk hedef DNA giraz enzimi, Gram pozitiflerde ilk hedef topoizomeraz IV dür. Siprofloksasinin spektrumu oldukça geniştir. MRSA enfeksiyonlarında etkisi yüksektir [100].

Levofloksasin

Levofloksasin, siprofloksasin ile beraber florokinolonlar grubunun üyeleridir. Florokinolonlar, topoizomerez sınıfı enzimlerden, DNA giraz ve topoizomerez IV enzimlerini inhibe ederler ve bakteriyel DNA sentezini bozarlar. Florokinolonlar, *S. aureus* ve *S.epidermidis* gibi mikroorganizmalara karşı etkilidirler [101].

Moksifloksasin

Moksifloksasin 4. kuşak kinolonlar grubuna dâhildir. Bütün kinolonlar gibi topoizomerezlara etki göstererek DNA sentezini inhibe eder [101].

Rifampisin

Rifampisinler sırasıyla *Streptomyces mediterranei*, *Nocardia mediterranei* ve *Amycolatopsis mediterranei* olarak isimlendirilen bir actinomisetin ürettiği rifampisin B'nin semisentetik türevleridir. Duyarlı bakterilerde DNA kontrolü altında yapılan mRNA sentezini, RNA polimeraz enzimini inhibe ederek bakterisit etki gösterir. Stafilokoklara karşı etkilidirler [102].

Trimetoprim/sülfametaksazol

Trimetoprim ve Sülfonamid kombinasyonundan oluşan antimetabolitler gurubunda bir antibiyotiktir (91). Bakteri hücresi, DNA sentezi için gerekli olan folik asidi kendi sentezler. Trimetoprim, folik asit sentezinde görev alan dihidrofolat redüktaz enzimini, sülfametaksazol ise tetrahidropiteroik asit sentetaz enzimini inhibe eder ve bu yolla DNA sentezini engeller [103].

Daptomisin

ABD'de 2003 yılında kullanıma giren siklik lipopeptid sınıf antibiyotiklerin birincisidir. Etkisini hücre duvarına bağlanarak hızlı bir şekilde membran depolarizasyonu ve hücreden potasyum pompalanmasını sağlamak, ardından da protein, DNA ve RNA sentezlerinin bozulması sonucu hücre ölümünü gerçekleştirmek şeklinde gösterir [104]. Enterekoklara

biraz daha fazla yüksek konsantrasyonda olmak şartıyla vankomisine dirençli suşlar da dahil, tüm stafilokok, enterokok ve streptokoklara hızla bakterisidal etki gösterir [105]. Antibiyotiklere karşı çabuk direnç geliştirdiklerinden, uygun antibiyotiğin seçimi için antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması gereklidir. Penisilinaz üretiminin *S.aureus* suşlarında %95'ten fazla saptanması nedeni ile penisilinler günlük uygulamada kullanılmamaktadır. Bakteriyemi, pnömoni, endokardit gibi ağır stafilokok infeksiyonlarda yüksek doz ve uzun süreli antibiyotik uygulanması gerekir, gerekirse bir aminoglikozidle kombinasyonu da kullanılmalıdır [29,64].

Hastane kökenli ağır infeksiyonlarda MRSA sıklığı göz önünde bulundurulmalıdır. MRSA sıklığı yüksek olan hastanelerde glikopeptidler ilk seçilecek ilaçlardır. İzole edilen etkenin metisiline duyarlı olması halinde nafsiline geçilebilir [64]. Önemli yan etkilerinin olması, tedavi maliyetinin pahalı olması glikopeptidlerin olumsuz yönleridir. Fusidik asit glikopeptid antibiyotiklere göre, düşük maliyet ve oral kullanım kolaylığı açısından alternatif oluşturabilecek bir antibiyotiktir, diğer antibiyotiklerle birlikte kombine kullanılabilir [64].

2.11. *S.aureus* 'da Antibiyotiklere Direnç

Herhangi bir mikroorganizmanın antibiyotiklerin üremeyi durdurucu veya öldürücü tesirinden korunabilme kapasitesine direnç denir. Antibiyotiklerin keşfinden bu yana antibiyotik kullanımına bağlı olarak çok az bir zaman zarfında antibiyotiklere direnç gelişmiştir. Bu durum penisilin G'nin 1941 yılında tedavide kullanılmaya başlanması ile meydana gelmiştir. Sonrasında tedavide kullanılmak üzere bulunan her antibiyotiğe karşı direnç gelişimi artmıştır [105,106].

Penisilinaz antibiyotiklere genel direnç mekanizmaları

Direnç, 3 temel mekanizmayla meydana gelmektedir [106].

- İlacın hedefine etkili miktarda gönderilmesinin engellenmesi
- Penisilin Bağlayan Protein moleküllerinin değişmesi
- İlacı inaktif hale getiren beta laktamazların üretimi

2.11.1. İlacın hedefine etkili miktarda gönderilmesinin engellenmesi

Bu direnç mekanizması, ilacın hücre içine alınmasındaki azalmadan ya da hedefine ulaşmadan dışarı atılmasını sağlayan aktif pompa sistemlerinden kaynaklanır [105]. Bakterilerde bulunan aktif pompa sistemleri antibiyotiğin hücre içinde etkin konsantrasyona ulaşmasını engellemektedir [106].

2.11.2. Penisilin Bağlayan Protein (PBP) moleküllerinin değişmesi

Penisilin Bağlayan Proteinler, yüksek molekül ağırlığına sahip D,D-transpeptidazlar ile düşük molekül ağırlığına sahip D,D karboksipeptidazlardır. Hücre duvarındaki peptidoglikan tabakasında görev alarak çapraz bağların meydana gelmesini sağlarlar [106]. Beta-laktam ajanlar, penisilin bağlayan proteinlerin substratlarına benzerler. Bu benzerlikten dolayı penisilin bağlayan proteinler, penisilinazlara kovalan bağ ile bağlanarak inhibe olurlar. Penisilinaz ilgisi düşük penisilin bağlayan proteinlerle ilgili dört direnç mekanizması vardır. Bunlar;

- Birbirine yakın türlerden gen transferi ile yeni mozaik penisilin bağlayan proteinlerin oluşmasıyla direnç gelişir.
- Bakterinin yeni bir gen kazanması. Bu yeni genin penisilinaz afinitesi düşük ise direnç gelişir.
- Düşük affiniteli penisilin bağlayan proteinin aşırı miktarda yapımı sonucu direnç gelişir.
- Penisilin bağlayan proteinlerin gen dizilerindeki korunmuş bölgelerdeki aminoasit değişikliklerine bağlı affinite değişimleri ortaya çıkarabilir. Bu durumda da direnç gelişebilir [106].

Penisilin Bağlayan Proteinlerin değişimi sonucu ortaya çıkan direnç *S. aureus*'un betalaktam tedavisinde sıkıntılara neden olmaktadır. [52]. Stafilokokların beta laktam direncindeki en önemli mekanizması, tüm beta laktamlara karşı düşük afiniteli PBP2a olarak adlandırılan yeni bir PBP yapımıdır [106].

2.11.3. İlacı inaktive eden beta laktamazların üretimi

S. aureus, penisilinaz enzimiyle penisilin türü antibiyotiklere karşı direnç geliştirir. Penisilinazlar, beta laktamın siklik amid bağlarını kırarak bu ajanların etkinliğini engelleyen enzimlerdir. Stafilokok grubu bakteriler, Gram pozitif bakteriler arasında beta laktamaz üreten başlıca patojenlerdir. Bu bakterilerin beta laktamazı, penisilinaz özelliğindedir ve grup 2a'da yer alır [52,107].

Stafilokok grubu bakterilerde penisilinaz üretimini kontrol eden gen, *bla* genidir. Penisilin antibiyotiği varlığında bu gendeki baskılayıcı etki ortadan kalkarak penisilinaz üretilmeye başlanmaktadır. Stafilokoklarda bu enzimin üretildiğini saptamak için on ünite penisilin diski ve bir miligram oksasilin diski beraber kullanılarak direnç belirlenebilir [108].

Metilsilin direnci

Metisilin, oksasilin, nafsilin, kloksasilin, dikloksasilin gibi β -laktamazla hidrolize olmayan antibiyotiklere karşı bakteri tarafından geliştirilen dirence metilsilin direnci adı verilir [1]. Metisilin direnci gösteren *S. aureus* suşlarına MRSA denir. MRSA suşları tüm β -laktam antibiyotiklere dirençli kabul edilir [50]. Metisilin β -laktamaz enzimine dirençli antibiyotikler içerisinde 1959 yılında ilk üretilen ve klinikte ilk kullanılan antibiyotiktir. Fakat interstisyel nefrit yapma ve ciddi yan etkilerinden dolayı klinik kullanımdan kısa sürede kaldırılmıştır. Stafilokoklardaki metisilin direnci üç farklı mekanizma ile meydana gelir;

Kromozomal (İntrinsik) metisilin direnci

MRSA'da en sık karşılaşılan direnç mekanizmasıdır. Metisilin duyarlı *S. aureus*'larda 5 adet PBP bulunmaktayken metisilin dirençli *S. aureus*'larda ise bunlara ek olarak PBP2a olarak adlandırılan 78 kDa ağırlığında farklı bir PBP sentezlenmektedir. PBP2a, β -laktam yapısındaki antibiyotiklere karşı düşük afinite göstererek peptidoglikan sentezini devamına ve sonuç olarak dirence neden olur [37]. PBP2a, *mecA* geni tarafından kodlanır ve bu genin ekspresyonu *mecR1* ve *mecI* genleri ile kontrol edilir [109]. *mecA* geni, bakteri kromozomunda stafilokokalkaset kromozomu (Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*; SCC*mec*) üzerinde yer alır [110].

Kromozomal metisilin direnci fenotipik olarak üç şekilde ortaya çıkmaktadır;

- a) Homojen direnç; Hücrelerin hepsi yüksek konsantrasyondaki metisilin varlığında üreyebilir ve yüksek düzeyde direnç ortaya koyarlar [111].
- b) Heterojen direnç; Bakteri topluluğunda bulunan tüm hücreler mecA genini taşımalarına rağmen sadece belirli bir kısmında direnç görülür. Bu hem duyarlı hem dirençli yapıya fem sisteminin neden olduğu düşünülmektedir.
- c) Eagle-tip direnç; Bakterilerin çoğunluğu (%99.9 veya daha fazlası) düşük metisilin konsantrasyonlarına (1-5 µg/mL) duyarlı iken, çok az bir kısmı ise yüksek metisilin konsantrasyonlarına (≥ 50 µg/mL) direnç göstermektedir. Bu tip direncin, sağlam mecA regülatör genlerinin yüksek metisilin konsantrasyonlarında PBP2a sentezini indüklemeleri sonucu olduğu düşünülmektedir [111].

Aşırı miktarda β -laktamaz salgılanması

Aşırı miktarda β -laktamaz salgısı sınırda (borderline) metisilin direncine neden olmaktadır. Metisilin β -laktamaz enzimine dayanıklı olmakla birlikte McDougal ve arkadaşları metisiline direnç gelişmesine aşırı miktarda β -laktamaz üretiminin de neden olabileceğini göstermişlerdir. Bu tip suşlar Borderline resistant *S. aureus* olarak adlandırılırlar [112].

PBP'lerdeki yapısal değişiklikler

“Intermediate” metisilin direnci olarak da tanımlanan bu direnç tipinde PBP'lerdeki yapısal değişiklikler sorumludur. Orta düzeyde direnç gösteren bu suşlar β -laktamaz üretemezler ve mecA geni taşımazlar. Ancak metisiline dirençlidirler. Modified resistant *S. aureus* adı verilen bu suşların PBP'leri mutasyonlar sonucu yapısal değişikliğe uğrar ve β -laktam antibiyotiklere düşük afinite gösterirler. Bunun sonucunda da direnç gelişimi gözlenir [113].

Glikopeptit antibiyotiklere direnç mekanizmaları

Metisilin dirençli *S. aureus* bakterileri metisilin, makrolidler, penisilinler, tetrasiklinler ve kloramfenikollere karşı dirençlidirler. Bu yüzden metisilin dirençli *S. aureus* infeksiyonlarında tedavi için glikopeptid antibiyotikler kullanılmaktadır [114]. Ancak 1997

yılında önce Japonya ve sonrasında Amerika Birleşik Devletleri'nde vankomisine duyarlılığı azalmış *S.aureus* izolatları bildirilmiştir [115].

Vankomisin direnci

Vankomisin hücre duvarının temel yapı taşı olan peptidoglikanın sentezi esnasında D-alanin-D-alanin ucuna bağlanarak transpeptidasyonu engelleyerek hücre duvarı sentezini bozar. Bakterilerde *vanA* geni varlığında ise D-alanin-D-alanin yerine D-alanin-D-laktat sentezlenir. Vankomisinin bu moleküle affinitesi çok düşüktür. Böylece vankomisin hedef bölgesine bağlanamaz ve hücre duvar sentezi inhibe edilemez. VRSA suşlarının gösterildiği ilk çalışmaların hepsinde PCR ile *vanA* geni saptanmıştır. Bu genin *S. aureus*'lara vankomisine dirençli enterokoklardan aktarıldığı düşünülmektedir [116].

Daptomisin direnci

Enterokoklarda ve *S. aureus* suşlarında daptomisine karşı direnç çok nadirdir. Stafilokokların daptomisin direncinde lizilfosfatidilgliserol sentetazı kodlayan (*mprF*), histidin kinazı kodlayan (*yycG*) ve RNA polimeraz subunitlerini kodlayan (*rpoB* ve *rpoC*) genlerdeki mutasyonlar etkilidir. *S. aureus* suşlarında daptomisinin direnci antibiyotiğin hücre membranına bağlanmasının azalmasıyla ortaya çıkar [117,118].

Aminoglikozid direnci

Stafilokok grubu bakterilerde bu direncin görülmesinin en önemli nedeni bazı enzimlerin aminoglikozidleri değiştirebilmesidir. Bu enzimler asetil ve adenil transferazlar ile fosfotransferazlardır [119]. Bu enzimlerin yapılarına asetil, adenil ve fosforil grupları eklenirse antibiyotik özelliğini yitirerek etkisizleşir [52].

Makrolid, linkozamid, streptogramin(MLSB) direnci

MLSB grubu diye sisimlendirilen antibiyotiklerdir [120]. Bu grup antibiyotikler kimyasal yönden birbirinden çok farklıdır. Fakat etki mekanizmaları birbirine benzerdir [52]. Bu grup antibiyotiklere karşı direnç *erm* gen bölgesinin kazanımına bağlıdır. Genetik bir yolla taşınan *erm* genleri belirli enzimleri kodlayarak antibiyotiğin hedefini değiştirir [52].

Metisilin dirençli *S.aureus* 'larda *erm A* geni, metisilin duyarlı *S.aureus* 'larda ise *erm C* geni iş görmektedir [121]. Ayrıca *S.aureus* 'da *mrs* genleri pompa proteininin (efflux) sentezine yol açarak makrolidlere karşı direnç ortaya çıkmasına sebep olmaktadır [108].

Kloramfenikol direnci

Kloramfenikol, asetil transferaz enziminin üretilmesine paralel olarak ortaya çıkan bu direnç antibiyotiğin etkisinin kaybına sebep olur. Bu enzim birçok bakteride yaygın bir biçimde bulunur [52,120].

Sulfonamid ve trimetoprim direnci

Sülfonamid direnci, genetik taşımayla(plazmid gibi) oluşabilecek yeni genlerle veya noktasal mutasyonlara bağlı yeni sentetaz enzimlerinin oluşmasıyla meydana gelir.

Trimetoprim(TMP) direnci, bir transpozonda kodlanan *dfrA* ve *dfrB* genleri tarafından kodlanarak ortaya çıkarılır. Bu genler dihidrofolat enzimini kodlar. Bu enzim de trimetoprimle bağlanarak dirence yol açar [52,120].

Kinolon direnci

Kinolon direnci, nokta mutasyonlar sonucu oluşur. Nokta mutasyonların DNA giraz ve topoizomera IV enzimlerinde olması gerekmektedir. Bu enzimleri kodlayan gen bölgeleri, DNA giraz için *gyrA* ve *gyrB*, topoizomera enzimi için *grlA* ve *gyrA*'dır [120].

Rifampin direnci

Rifampin direnci kromozomal mutasyonlar sonucu ortaya çıkar. RNA polimeraz enziminin alt birimlerinden birinin adı *betad*ır. Bu birimi kodlayan *rpa B* genin mutasyonu bu direncin oluşmasına neden olur [120].

Linezolid direnci

Linezolid direnci derin organ tutulumu, yabancı cihaz varlığı veya uzun süreli linezolid tedavisi durumlarında ortaya çıkar. ABD ve diğer ülkelerde *S. aureus* izolatlarında

linezolid direnci üzerine yapılan çalışmalarda direnç oranı düşük olarak saptanmıştır. Genellikle *S. aureus*'un 23S rRNA'sının beşinci kangalında meydana gelen G2576T mutasyonuna bağlı olarak direnç gelişir. Ribozomal proteinlerde (L3 ve L4) meydana gelen mutasyonlar ve plazmid yoluyla cfr geninin aktarılması sonucunda da linezolid direnci görülebilir [122,123].

Tigesiklin direnci

Tigesikline direnç gelişimindeki en önemli mekanizma aktarılabılır tetrasiklin direnç genlerinin (tet) efluks pompa proteinlerinin yapımını sağlayarak antibiyotiği dışarı atmasıdır. Fakat efluks pompaları glisilsiklinleri hücreden dışarı atmadığı için bu direnç mekanizması tigesikline etkili değildir. Yine bazı bakterilerde bulunan çoklu ilaç transport sistemleri tigesiklinin MİK değerlerinde dört kat artışa neden olmakla birlikte direnç sağlayamamaktadır [124].

2.12. MRSA'nın Epidemiyolojisi

Stafilokoklar ilk kez 1881 yılında enfeksiyon nedeni olarak dile getirilmişlerdir. Penisilinden sonra metisilin bu bakterilere ait enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Bir süre sonra da metisiline karşı direnç ortaya çıkmıştır. Ortaya çıkan bu dirence bağlı olarak metisilin dirençli *S.aureus* suşları tanımlanmıştır [52,125]. Metisilin dirençli *S.aureus* 'lar elde edildikleri kaynaklara göre 2 gruba ayrılır. Bunlar toplum kaynaklı MRSA türleri (TK-MRSA) ve hastane kaynaklı MRSA türleri olarak isimlendirilirler. Toplum kaynaklı olanlar deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olurken hastane kaynaklı olanlar çeşitli önemli hastalıklara ve hatta ölümlere sebep olmuşlardır [126].

MRSA enfeksiyonları Avrupa ve Amerika'da 1970'li yılların sonlarında endemik olarak ortaya çıkmaya başlamıştır. Daha az olmakla birlikte, MRSA'lar yaşlı bakım evleri ve kreşlerde toplum kaynaklı enfeksiyonlarda da etken olarak görülebilmektedir. Hastane kökenli enfeksiyonların neredeyse %66'sı yoğun bakım ile ilgili ünitelerde görülmektedir [113]. Toplumda iki tip MRSA dolaşmaktadır:

1. Hastane ile ilişkili MRSA: Topluma yayılarak risk faktörü olan kişileri enfekte eden hastane suşlarıdır. Bu suşlar bazen toplum kaynaklı olarak anılmaktadır.
2. Gerçek toplum kaynaklı MRSA: Toplumda kazanılıp risk faktörü taşımayan kişileri enfekte eden suşlardır [127].

Epidemiyolojik çalışmalar sonucunda vaka tanımlarının belirlenmesinde MRSA izolasyonunun zamanı temel alınmıştır. Çoğu araştırmacı; ayaktan ve hastaneye kabulden sonra 48-72 saat içinde örnek alınan hastada kültürde MRSA üretildiğinde risk faktörlerinin olmaması durumunda, izolatin gerçek TK-MRSA olarak değerlendirilmesini, risk faktörlerini taşıyanların ise Hastane Kaynaklı MRSA (HK-MRSA) olarak tanımlanması gerektiğini savunmaktadır [128].

İlk toplum kökenli enfeksiyona sebep olan metisilin dirençli *S. aureus* suşu, Amerika Birleşik Devletleri'nde 1980 yılında tanımlanarak literatüre geçmiştir. Daha sonra yine 1998'de Amerika ve ardından aynı yıl içinde Avustralya'daki yerli toplumda metisilin dirençli *S.aureus* enfeksiyonları tanımlanmıştır. 1999 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde dört çocuğun toplumsal kaynaklı metisilin dirençli *S. aureus*'tan öldüğü belirlenince bu yöndeki araştırmalar artmıştır [129,130]. Herhangi bir kaynaktan elde edilen metisilin dirençli *S.aureus* suşlarının kaynağının toplum mu yoksa hastane mi olduğunu belirlemek zordur. Bunun için Amerika Birleşik Devletleri'nde yer alan Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi kriterler belirlemiştir. Bu kriterler şunlardır:

1. Ayaktan muayene edilen bir hastaya Metisilin dirençli *S.aureus* tanısı konulması ve kişinin hastaneye yatırılması sonucu ilk 48 saat içinde alınan örneklerden Metisilin dirençli *S.aureus* izole edilmesi,
2. Kişinin daha önceden Metisilin dirençli *S.aureus* geçmişinin olmaması,
3. Kişinin son bir yıl içinde bu etkenle karşılaşabileceği bir yerde(hastane, diyaliz merkezi vs) yatış hikayesinin olmaması,
4. Kişinin vücudundaki deriyi delen herhangi bir etkenin(katater, protez vs) olmaması durumunda izole edilen suşlar toplum kaynaklı Metisiline dirençli *S.aureus* suşları olarak kabul edilmektedir. Ancak her zaman için kesin tanı moleküler analizlerle konulmaktadır [131].

Toplum kaynaklı Metisilin dirençli *S.aureus* suşları hastane kaynaklı olanlara göre beta laktam grubunun haricindeki antibiyotiklere daha duyarlıdır [132]. Toplum kaynaklı Metisilin dirençli *S.aureus*'lar hastane kaynaklı olanlara kıyasla klindamisin, tetrasiklin, rifampin gibi ajanlara daha duyarlıdır. Ayrıca toplum kaynaklı olanlarda Panton-Valentine Lökositidin ile k,c,a gibi enterotoksinler daha sık bulunur [133]. Toplum kaynaklı ve hastane kaynaklı Metisilin dirençli *S.aureus* 'lar arasındaki farklılıklar Çizelge 2.6'da özetlenmiştir [134].

Çizelge 2.6. TK-MRSA ve HK-MRSA arasındaki farklılıklar [134]

	TK-MRSA	HK-MRSA
Risk faktörleri	CA-MRSA taşıyıcısı olabilecek kişilerle direk ya da dolaylı temas, kreş ve bakım evi görevlileri, sporcular, mahkumlar, askerler, intravenöz ilaç kullananlar, eşcinsel erkekler ve daha önce antibiyotik kullananlar.	Hastanede yatarak tedavi olmuş hastalar, HA-MRSA taşıyıcısı olabilecek kişilerle direk ya da dolaylı temas, hemodializ hastaları, devamlı katateri bulunanlar ve böbrek yetmezliği, kafa travması ve diyabet gibi altta yatan hastalığı bulunanlar
Yaygın infeksiyon alanı	Deri ve yumuşak doku	Solunum sistemi, üriner sistem, kateter aracılı infeksiyonlar ve sepsis
Panton-Valentin lökositidin varlığı	Genellikle mevcut	Nadir
Non beta laktam antibiyotiklere duyarlılık	Genellikle duyarlı	Genellikle dirençli

Günümüzde hem dünyada hem de ülkemizde hastane kaynaklı *S.aureus* izolatlarındaki metisilin antibiyotiğine karşı dirençte ciddi artışlar görülmektedir [105]. Ülkemizde 29 hastanenin katılımı ile yapılan en geniş kapsamlı çalışmada; stafilokok suşlarının % 7.4-53.3'ü, *S.aureus* izolatlarının ise % 26'sı metisiline dirençli olarak belirlenmiştir [135]. Çeşitli çalışmalarda *S.aureus* izolatlarında metisilin direnci % 20-63 arasında bildirilmektedir [136,137,138].

2.13. *S.aureus* 'u Tiplendirme Yöntemleri

Bakterilere ait izolatların tiplendirilmesinin birçok faydası vardır. Salgın hastalıklarının araştırılmasında, hastane kökenli yayılımın incelenmesinde ve suşların evrimsel bağlantılarının ortaya konulmasında değerlidir. Tiplendirme yöntemleri temel olarak ikiye ayrılır [136,137,138];

1. Fenotipik yöntemler
2. Genotipik yöntemler

2.13.1. Fenotipik yöntemler

Geleneksel konvansiyonel yöntemlerdir. Bu yöntemler mikroorganizmaların birbirleriyle bağlantılı olan ya da olmayan yönlerini ortaya çıkarmaktadır. Mikroorganizmaların birçok özelliğine bağlı fenotipik yöntemler mevcuttur. Bu yöntemler biyotipik profillemeye, antibiyotik duyarlılığına, duyarlı olunan faj tiplerine ve protein içeriklerine göre şekillenmektedir. Mikroorganizmalar fenotipik özelliklerini değiştirebilirler. Bu yüzden fenotipik özelliklerine göre farklılıklarını ortaya koymak bir dezavantajdır. Mikroorganizmaların fenotipik özelliklerini değiştirmeleri çevreye karşı bir cevap niteliğinde olabilir. Ayrıca çeşitli muatsyonlar genler üzerinde değişiklikler meydana getirebilir. Buna bağlı olarak ilgili gen ya da genlerin fonksiyonlarında bozulma meydana gelebilir. Böyle durumlarda fenotipi farklı fakat genotipi benzer suşlar ortaya çıkabilmektedir [40]. Bunun aksine genotipi benzer olmayan suşların antibiyogramları aynı olabilmektedir. Faj tiplendirmesi de bir fenotipik tiplendirme yöntemidir. Bu yöntemle birçok *S.aureus* suşu tiplendirilememektedir [59,139]. Çevresel baskılar, değişen antijen yapıları, fenotipik özelliklerin bazen baskılanan ya da korunan gen bölgelerinde kodlanması, ticari olarak satılan ve ihtiyacı hissedilen bazı fenotipik ayıraçların elde edilememesi ve türler arası farklılıkların türleri birbirinden ayırmak için yeterli olmaması gibi nedenlerden dolayı fenotipik yöntemlerin hassasiyeti azalabilir [142].

Antimikrobial duyarlılık testleri

Antimikrobiyal duyarlılığı ölçen bu analizler, rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılmak için uygun, uygulanması kolay, hızlı sonuç veren ve maliyeti düşük bir fenotipik yöntemdir. Bu test, antibiyotik direnç paterninin tanımlanması açısından önem taşımaktadır.

Ayrım gücünün düşük olması gibi önemli bir dezavantajı vardır. Aynı suşlar, farklı antibiyogram profiline sahip olabilir. Bunun aksine farklı suşlar da aynı antibiyogram profiline sahip olabilir. Bu tablo plazmid ya da transpozonla açıklanabilir. Çünkü bunlar bazı gen bölgelerini taşıyabilirler [141]. Antibiyotik duyarlılıkları zon çaplarına göre

değerlendirmek daha kaliteli sonuç verir. Bu ölçüm ve değerlendirme antibiyogramın tiplendirme gücünü arttırır [139,141]. Bu tip antibiyogramların en az ribotiplendirme kadar faydalı ve kullanılabilir olduğu epidemiyolojik bir araştırmada gösterilmiştir [143].

Faj tipi

Bakteriyofajlar, bakteri hücrelerini enfekte ederek çoğu zaman bakteri hücrelerinin erimesine neden olan virüslerdir. Epidemiyolojik çalışmalarda bakteriler farklı bakteriyofajlara olan duyarlılık ve dirençlerine göre tiplendirilmektedirler. Stafilokoklarla ilgili tiplendirme sistemleri arasında sadece faj tiplendirilmesi standardize edilmiştir. *S. aureus*’un epidemiyolojik analizinde bakteriyofaj tiplendirilmesinin kullanımı ilk kez 1940’lı yıllarda olmuştur [141,145]. Faj tiplendirmeleri Dünya Sağlık Örgütü’nün kabul ettiği yaklaşık 24 standart stafilokok fajı kullanılarak yapılmaktadır. Bu bakteriyofajlar her birisinin konuk olduğu özgül duyarlı *S. aureus* konak kökenlerinde sürdürülmekte ve denenecek stafilokok kökenlerine uygun yöntemler uygulanarak, onları eritmelerine göre tiplendirilmektedirler. Sonunda incelenen stafilokok kökeni duyarlı olduğu fajın grup ve tipine göre isimlendirilmektedirler [43]. *S. aureus* bir grup bakteriyofaja karşı özgül duyarlılık gösterebilmekte ve belirgin bakteriyofaj dizisi kullanılarak tiplendirilmektedir. *S. Aureus*’un faj tiplendirilmesi özellikle hastane enfeksiyonlarının epidemiyolojisini izlemek bakımından önemlidir. Faj tiplendirme yöntemi, teknik olarak oldukça fazla dikkat gerektiren ve zaman alıcı bir yöntemdir. Bu yöntemin önemli bir dezavantajı vardır. Tiplendirilemeyen suş oranı yüksektir [141].

Biyotiplendirme

Her bakteri kökeninde görünüm, hücre ince yapısı, boyanma özellikleri, hareket, spor varlığı, üreme özellikleri, koloni görünümü, üreme sıcaklığı, metabolizma ve enzimler ile ilgili yüzlerce karakter incelenir. Bu özellikleri bakımından yakından uzaktan benzerlik gösteren kökenler gruplandırılır. Bu gruplarda belirli bir ortalama çerçevesinde ortak karakterler gösteren kökenler tür tipi olarak kabul edilir. Türler arası ilişkilerden cinsler ve daha ileri olarak familyalar oluşturulur. Aslında güvenilir bir yöntem olmakla beraber bu yoldan giderek cins, familya ve daha ileri sınıflandırmaların yapılması zorluk göstermektedir. Bu zorluk, eldeki olanaklarla mikroorganizmalara ait daha çok ve yeterli sayıda karakter saptanamamasından kaynaklanmaktadır [43]. Biyotiplendirme ile bir

izolatın biyokimyasal özellikleri, koloni morfolojisi ve çevresel şartlara toleransı (selektif besiyerlerinde ve ekstrem pH ve sıcaklıklarda üreme vb.) gibi özgül metabolik aktivite paterni ortaya konur. Biyotipik özelliklerden klasik olarak sınıflandırmada (taksonomi) ve çoğu klinik mikrobiyoloji laboratuvarında rutin olarak türlerin identifikasyonunda yararlanılmaktadır. Güvenilir, otomatize veya modüler paneller ticari olarak bulunmaktadır. Ancak, *S. aureus* suşlarının ayırımında biyokimyasal reaksiyonların kullanımı yetersizdir [146].

Multilokus enzim elektroforezi (MLEE)

Birçok gen bölgesindeki farklı allelelere sahip genler arasında ayırt edici bir metottur. Bu method uygulanırken enzimler iyi seçilmelidir. Gen ürünleri arasında ayırt edici bir method olduğu için bazı DNA parmak izi yöntemlerine göre daha çok tercih edilir. Bu yöntem direkt uygulanır. Multilokus enzim elektroforez yönteminde enzimler bulundukları lokuslardaki farklılıkları yansıtan bir ayna görevi görürler. Enzimler arasındaki farklılıklara göre de elektroforetik tipler meydana gelir. İki suş arasındaki benzerlik katsayısı bu yöntemle farklılıklar gösteren lokusların oranı ile ifade edilmektedir. MRSA izolatları için kullanıldığında tiplendirebilme yeteneği ve tekrarlanabilirliği iyidir. Yöntemin ayırım gücü yöntemde kullanılan enzimlere bağlıdır [141].

Zimotiplendirme

Zimotiplendirme yöntemi, multilokus enzim elektroforezine benzemektedir. Bazı bakterilerdeki esteraz enzimlerinin elektroforez ortamındaki farklılıklarına göre ayırım yapmaktadır. *S. aureus*, anoda olan afinitelere göre A, B ve C olmak üzere üç elastaza sahiptir. Bu yöntemle tüm izolatlar tiplendirilebilmektedir ve paternler stabil ve tekrarlanabilir. Ayırım gücü kapsüler tiplendirmeden iyiye de faj tiplendirmesi veya “Pulsed Field Gel Electrophoresis” (PFGE)’den belirgin olarak daha kötüdür [147].

Kapsüler serotiplendirme

Sınıflandırmada serolojik yöntemlerden de yararlanılır. Kapsüler polisakkarit tiplendirmesini *S.aureus* 'lar için ilk kez Karakawa ve Vann geliştirmişlerdir [141,148]. Yapılan bir çalışmada 11 kapsüler tip tanımlanmış olup, *S.aureus* klinik izolatlarının

%85-90'ı tip 5 ve 8 olarak bulunmuştur [149]. Yapılan bazı çalışmalara göre diğer bakteriyel özelliklerle kapsüler tipler arasında güçlü bir korelasyon bulunmuştur. Özellikle bazı faj tipleri aynı kapsüler tipi göstermektedirler. MRSA'lar tipik olarak kapsüler tip 5'tir [150,151]. Sonuç olarak, kapsüler tiplendirme düşük ayırım gücüne sahiptir ve epidemiyolojik çalışmalar için kullanışlı bulunmamıştır. Bir diğer dezavantajı tiplendirmede kullanılan reaktiflerin ticari olarak elde edilememesidir [141,146,148].

Tam hücre proteini elektroforezi

Bu yöntemde hücresel proteinler jel elektroforezi yardımıyla ayrılır. “Coomassie blue” ile boyama, 35S –metionin (ratio-PAGE) veya immunoblotting yöntemleri ile görünür hale getirilir. “Coomassie blue” boyasının kullanıldığı SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulphate-polyacrilamide gel electrophoresis) ve radio-PAGE ile KNS izolatlarının da tüm majör bakteriyel proteinleri incelenmekte ve türler arasında belirgin boyanma farklılıkları oluşmasıyla tanıya gidilmektedir. Tam hücre proteini elektroforezinde lizostafin aracılığıyla serbestleştirilmiş olan stafilokok proteinleri poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) yöntemi kullanılarak araştırılır. Bu yöntemle yaklaşık 50 protein bandı görüntülenebilir ve tekrarlanabilir paternler oluşur. Çok sayıda bant oluşmasına rağmen ilişkisiz MRSA izolatları arasındaki patern farkları azdır. Bu da zayıf bir ayırım gücüne yol açar. Ancak, bilgisayar yardımıyla bant yoğunluğu da dikkate alındığında daha iyi bir ayırım yapılabilir. Elektroforez koşullarında meydana gelen küçük değişikliklerden etkilenmesi tam hücre proteini elektroforezinin bir diğer dezavantajıdır [141,148].

İmmunoblot yöntemi (Immunoblotting)

İmmunoblot yönteminde elektroforez işlemi sonrası bakteriyel proteinler nitrosellüloz bir membran üzerine aktarılır. Bu işleme “blotting” adı verilir. Membran daha sonra spesifik antikorlar içeren tavşan veya insan serumuyla karşılaştırılır. Membran üzerindeki proteine bağlanmış spesifik antikorların varlığı enzimle işaretli antiimmünglobulinler yardımıyla saptanır [146]. İmmunoblot yöntemi, elektroforez koşullarından diğer protein elektroforezine dayalı tiplendirme yöntemlerine göre daha az etkilenir. Ayrıca oluşan bant sayısının daha az olması da yorum kolaylığı sağlar [141]. Bu yöntem MRSA'ların epidemiyolojisi ile ilgili çalışmalarda etkili bir şekilde kullanılabilmektedir [146,148]. Tüm MRSA izolatlarını bu yöntemle tiplendirmek mümkündür. Ancak salgın incelemelerinde

ilişkisiz izolatları yeterince ayırt edemeyebilmektedir [141]. Tenover'in çalışmasına göre fenotipik yöntemlerin en iyilerinden biri olan immunoblotting, bazı genotipik yöntemlerle kıyaslanabilecek kadar iyi sonuçlar vermektedir [144]. Bununla birlikte bu yöntem çok az sayıda araştırmacı tarafından kullanılmıştır. Yaygın olarak kullanılmamasının birkaç nedeni vardır; Birincisi bu yöntem teknik olarak yoğun bir çaba gerektirmektedir. Ayrıca ekstraksiyon işleminde kullanılan yöntem ve spesifik antikorun elde edildiği kaynak gibi teknik faktörlerin etkileri tam olarak tanımlanmamıştır. İkincisi translasyon, ısı, besiyeri bileşimi, pH gibi bakteriyel üreme koşullarından etkilenebilmektedir. Son olarak, saptanan bant paternleri komplekstir, küçük farklılıkların ortaya konması ve yorumlanması zordur [146,148].

2.13.2. Genotipik yöntemler

Kromozomal DNA ya da bakteri plazmidlerinin genotiplendirimi, fenotiplendirme yöntemlerindeki olumsuzlukları ortadan kaldırmış ve epidemiyolojik araştırmalarda daha güvenilir veriler sağlamıştır. Genotiplendirme yöntemleri fenotiplendirmeye göre; tiplendirebilirlik, tekrarlanabilirlik ve ayırıcı güç yönünden daha üstündür. Moleküler tiplendirme yöntemleri epidemiyolojik olarak ilişkisiz izolatlar arasındaki genetik farklılıkları ortaya koyarlar. Bu yöntemlerin temeli, mikroorganizmaların kromozomal ve ekstrakromozomal genetik elementleri arasındaki farklılığa dayanır. Pek çok yöntemde DNA'nın restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim işlemi ya da nükleik asit amplifikasyon (=çoğalma) işlemi vardır [148].

Plazmid profil analizleri

Plazmidler, temel olarak bakterilerde bulunan, küçük, dairesel, kendi kendine replike olabilen çift iplikçikli DNA molekülleridir. Plazmidler çoğunlukla antibiyotiklere dayanıklılık proteinlerini kodlayan genler taşırlar. Plazmidler değişik mekanizmalarla kazanılırlar ve genellikle proliferen olan konak suşlar arasında kalıtsal olarak aktarılırlar. Bununla birlikte kendiliğinden plazmid kayıpları da olabilir. Plazmidler genel olarak konak hücre için hayati değildir. Sıklıkla yapılarında mobil genetik elementler(transpozonlar) bulunan antibiyotik direnç determinanları taşırlar. Yoğun bir antibiyotik kullanımı olduğunda, plazmidler farklı suşlar arasında kolayca yayılırlar ve bir sağlık ünitesinde uzun süre kalıcılıkları devam eder. Plazmid DNA'sının kompozisyonu transpozonların kolayca kaybedilip kazanılması nedeniyle

değişir [146,148,153]. Plazmidler süperkoil, açık halka, lineer veya oligometrik gibi değişik moleküler formlarda olabilirler ve bu formların elektroforetik hareketleri, sayıları ve göreceli yoğunlukları farklılıklar gösterir [141,144,148]. Plazmid profil analizi teknik olarak basittir ve *S.aureus* 'larda uygulanan ilk DNA'ya dayalı tiplendirme yöntemidir. Bu yöntemde öncelikle plazmid DNA'sı ekstrakte edilir ve daha sonra rutin agaroz jel elektroforeziyle bakterinin taşıdığı plazmidlerin sayı ve büyüklükleri belirlenir. MRSA suslarının %90'ından fazlasında plazmid bulunmaktadır [141,144,148,153]. Yöntemin ayırım gücü ve tekrar edilebilirliği ile ilgili problemler hemen hemen tüm çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca plazmid tiplendirilmesine ait bilgilerin yorumu karışıktır [146]. Zuccarelli ve ark. bu problemin çözümü için S1 nükleaz kullanımını önermişlerdir [154]. Plazmid analizinin ayırım gücü ve tekrar edilebilirliği, plazmidlerin restriksiyon enzimiyle kesilmesi ve oluşan restriksiyon parçalarının sayı ve büyüklüklerinin analiz edilmesiyle de artırılabilir. Bu işleme "restriction enzyme analysis of plasmids (REAP)" denir. Teknik olarak basittir, az sayıda özel araç, gereç gerektirir ve göreceli olarak hızlı uygulanır [146,148,155]. Plazmid analizine göre tiplendirmedeki problemler, teknik konulardan çok plazmidin biyolojisindeki özelliklerden kaynaklanmaktadır. Plazmidlerin büyüklükleri doğru olarak ölçülse bile, aynı büyüklükteki plazmidler biyolojik farklılığa sahip olabileceklerinden suşlar arasında bu yöntemle ayırım yapılamayabilir. Ayrıca çoğu *S.aureus* izolatında sadece bir veya iki plazmid bulunur ve bu da sus ayırımında yetersiz kalmaktadır [1,148,156]. Aynı kromozomal genotipe sahip ve epidemiyolojik olarak ilişkili izolatlar, tüm plazmidini kaybetmesi, yeni plazmid kazanması veya plazmid yapısında yeni bir düzenleme nedeniyle çok farklı plazmid profili gösterebilirler. Buna karşın farklı suşlar da aynı plazmid profiline sahip olabilirler. Bütün bunların yanı sıra plazmid çalışmaları, sınırlı bir zamanda ve belli bir yerdeki salgına (örneğin tek bir hastane veya servisteki salgın) ait izolatların kısa sürede değerlendirilmesinde oldukça etkilidir [146,148]. Tekrarlanabilirliğinin olmaması plazmid analizi ile ilgili en önemli sorundur. Plazmid analiz yöntemini tek başına kullanmak yapılan araştırmaların sonucunu olumsuz etkileyebilir. Çünkü bu yöntemde suşlar arasında DNA transferi olma olasılığından dolayı hatalı veya varolmayan salgın sonuçları ile karşılaşılabilir [141,157].

Restriksiyon enzim analizi (REA)

Restriksiyon enzimleri DNA'yı spesifik bölgelerden kesen enzimlerdir. Bu yöntemde restriksiyon enzimleriyle hedef DNA spesifik yerlerden kesilir. Kesim sonucu ortaya çıkan

DNA parçaları elektroforezle yürütülür ve ayırım sağlanır. Stafılakok grubu bakterilerin kromozomunu kesmek için Bgl/II ve EcoR1 enzimleri kullanılır.

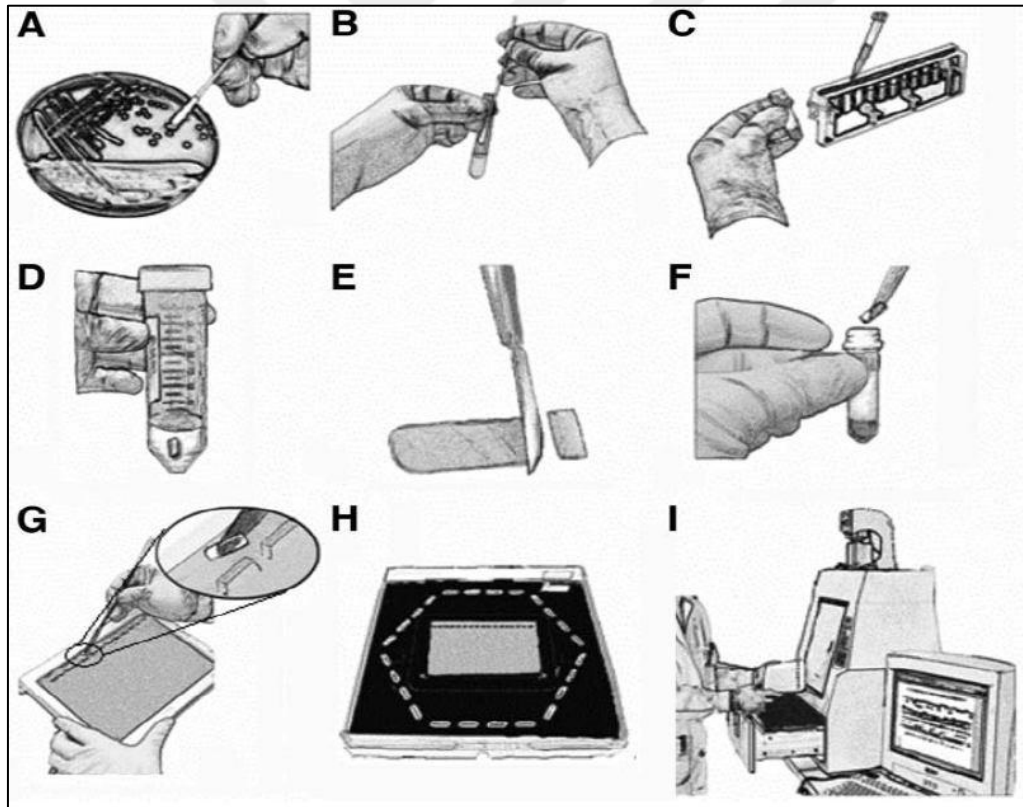
Konvansiyonel restriksiyon enzim analizi (REA)'nde, bakteriyel genomdan endonükleaz enzimi kesimiyle yaklaşık 0,5- 50 kb uzunluğunda yüzlerce parça oluşmaktadır. Farklı suşların REA profilleri de farklıdır. Çünkü suşların DNA dizileri, dolayısıyla da restriksiyon bölgeleri ve oluşan DNA parçalarının büyüklükleri farklılıklar gösterir [141]. Metislin dirençli *S.aureus* suşlarının tiplendirilmesinde bu yöntem kullanılır. Bu yöntemle sporadik ve epidemik suşlar birbirinden ayırt edilebilir [141]. Tüm izolatlar REA ile tiplendirilebilir, ancak yüzlerce banttıan oluşan profili, ayrılmayan veya üst üste gelen bantlar nedeniyle yorumlamak zordur. Ayrıca, bant paterni içinde plazmid veya kontamine DNA parçalarını restriksiyon parçalarından ayırmak zordur. Bu problemi ortadan kaldırmak için bilgisayar destekli bir sistem kullanılabilir, ancak bunu yapmak çoğu laboratuvar için zordur. Genelde REA diğır genotipik tiplendirme yöntemleriyle birlikte kullanılmaktadır [146].

Kromozomal DNA'nın pulsed-field jel elektroforezi (PFGE)

Schwartz ve Cantor tarafından 1984'te geliştirilmiş olan "Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)" yöntemi agaroz jel elektroforezinin bir varyasyonudur. PFGE yöntemi bakteriler arasındaki genetik farklılıkları ortaya koyar. Bu yönüyle moleküler çalışmalarda önemli bir genetik tiplendirme metodudur. Bu yöntem 1990 yılından bu yana bakterilerin incelenmesinde önemli ve değerli bir yöntem haline gelmiştir. Bu yöntemin özünde çok yüksek oranda tekrarlanabilirlik vardır. Bu özelliğı nedeniyle "altın standart" olarak kabul edilir [148,157].

PFGE yöntemi en özet haliyle hedef bakterilerin agar jeline gömülmesi, bakteri hücre duvarının parçalanarak genetik materyalin kesilmesi ve jel elektroforezinde belirli koşullarda yürütölerek ayrılması işlemidir. Elektriksel alanın periyodik olarak ("pulsed") yer değıştirdiğı bu elektroforez yöntemiyle, normal agaroz jel elektroforezi ile ayrılamayan megabaz büyüklüğündeki (10 kb'dan 1,5Mb'a kadar) DNA parçalarının ayırımı yapmak mümkündür [148,158,159]. Yaklaşık 2800 kilobaz (kb) büyüklüğünde olan stafilokok kromozomu *SmaI* enzimiyle (CCCGGG tanıma dizisi) kesildiğinde, büyüklüğü 10 ila 800 kb arasında 15-20 DNA parçasından oluşan bir restriksiyon profili ortaya çıkar. PFGE yönteminde, sıvı ve katı besiyerinde üretilen suşlar düşük erime ısılı agaroz ile karıştırlıp plastik kalıplar içine

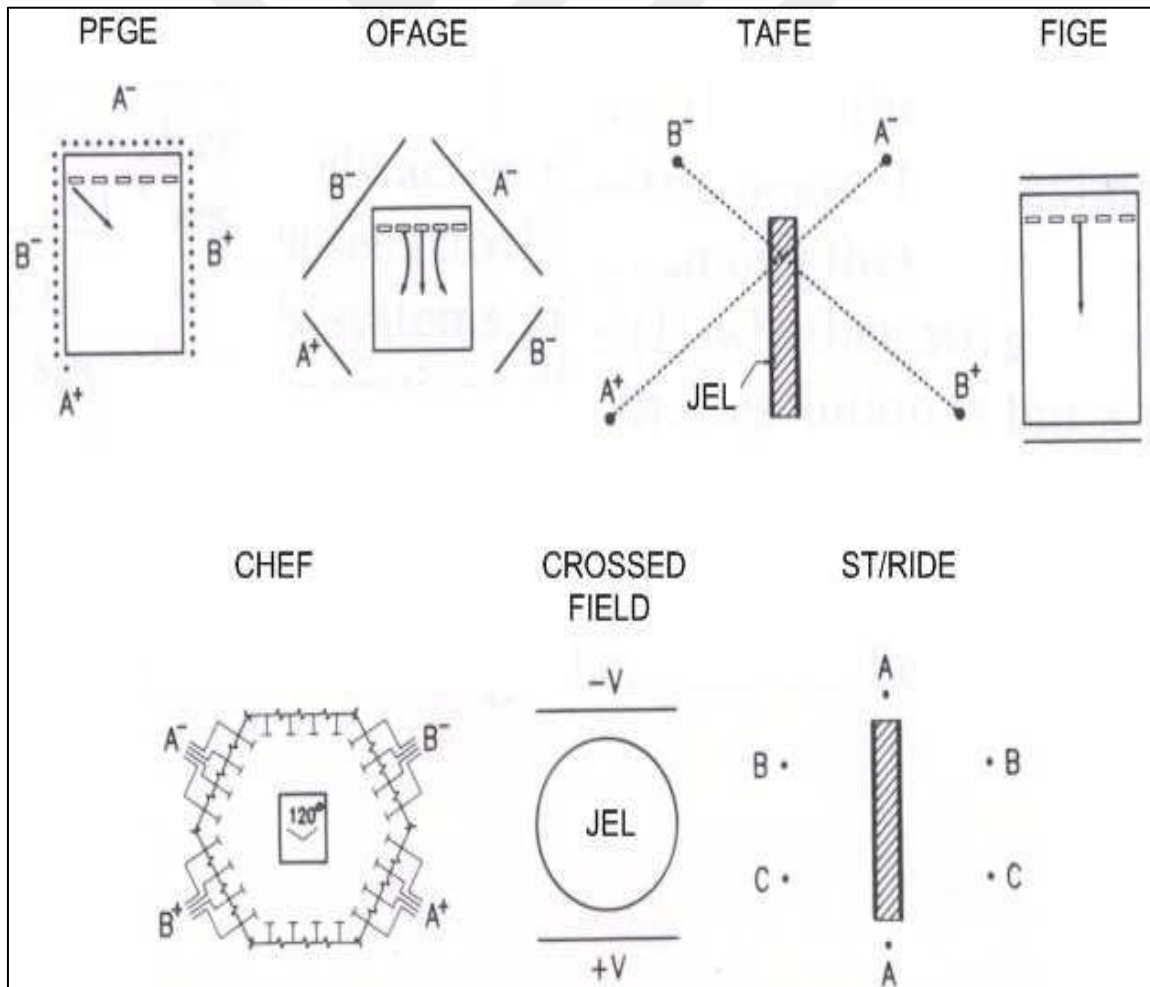
aktarılmaktadır. Bakteri türüne göre bir enzim ile parçalanıp, bir deterjan ile yıkanır ve restriksiyon enzimleriyle kesilir. Kesim sonucu oluşan DNA parçaları elektroforeze tabii tutularak yürütme jeli içinde spesifik tarakla açılmış çukurlara yerleştirilir. Belirli bir süre ve açıda yönü değişen belirli voltajdaki elektrik akımına tabi tutulur. Bu yolla 10-800 kilobazlık DNA'lar net bir biçimde birbirinden ayırt edilebilir. Elektroforez sonucu DNA bantlarının görünür hale gelmesi için yürütme jeli etidyum bromür ile en az 20 dakika boyanır. Boyama bitiminde jelin uygun görüntüleme sistemleriyle fotoğrafları alınır. Bu fotoğraflar uygun programlarla bilgisayarda işlenir, değerlendirilir ve PFGE profilleri oluşturulur. Oluşturulan bu profiller saklanarak zamanla veri bankaları oluşturulabilir [160]. Oluşturulan veri bankalarıyla daha önceki veriler kıyaslanabilir [14]. PFGE yönteminde bozulmamış bütün DNA gereklidir. Fakat konvansiyonel izolasyon yöntemlerinde DNA da kırılmalar olabileceğinden dolayı bu yönteme uygun değildir. PFGE yönteminin çalışma basamakları Şekil 2.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. PFGE yönteminin çalışma basamakları [161]

PFGE yönteminin değişik tipleri bulunmaktadır. En basit tipi “field-inversion gel electrophoresis (FIGE)” dir. Bu sistemde elektrik akımı belirli sürelerde ileri ve geri olmak üzere iki yönde uygulanmaktadır. FIGE, kolay ve düşük maliyetli bir yöntemdir. FIGE, 0.1- 200 kb büyüklüğündeki parçaları ayırmada kullanılır. Bu yöntemde elektrik akımı geri

ve ileri yönlerde uygulanabilmektedir. İleri yönde elektrik akımı için uygulama süresi geri yöne doğru olandan 3 misli daha uzundur. Yaygın kullanılan tipi ise “*contour-clamped homogenous electric field*” (CHEF)’ dir. CHEF, 3 Megabaz ve üzeri büyüklüklerde olan DNA parçalarının ayrıştırılmasında kullanılır. Bu sistemde altıgen biçiminde 120 derecelik açılarla yerleştirilmiş elektrotlarda sabit hızda elektrik akımı gelmektedir [160]. PFGE’nin en yaygın tipi CHEF’dir [162]. Bu yöntem dışında pulsed field gradient gel electrophoresis (PFGE), Orthogonal Field Alternation Gel Electrophoresis (OFAGE), Transverse Alternating Field Electrophoresis (TAFE), Field Inversion Gel Electrophoresis (FIGE), Orthogonal Field Alternation Gel Electrophoresis (OFAGE), crossed field gel electrophoresis (Waltzer) ve Simultaneous Tangential/Rectangular Inversion Decussate Electrophoresis (ST/RIDE) gibi yöntemlerde kullanılabilmektedir [162].



Şekil 2.3. PFGE sistemlerinin çeşitleri [162]

PFGE“nin iki önemli kısıtlılığı vardır:

- 1) Agaroz bloklar içine tüm tampon ve enzimlerin yeterince difüze olabilmesi için uzun süren birkaç inkübasyon periyoduna gereksinim vardır. Günümüzde *S. aureus* için işlemler kayda değer bir şekilde kısaltılmış olsa bile, 2 ila 4 günlük zahmetli bir çalışma süresi gerektirir [146,163,164]. Ancak blok içinde elde edilen DNA +4°C’de yıllarca stabil kalır ve diğer prosedürler için bu DNA kolayca elde edilebilir.
- 2) Göreceli olarak pahalı araç ve gereç gerektirmesidir [146]. Bununla birlikte tekrarlanabilirlik, yüksek ayırım gücü gibi faktörler nedeni ile çoğu laboratuvarlarda stafilocokların tiplendirilmesinde PFGE tercih edilen bir sistem haline gelmiştir [146,14,165]. Tüm stafilocok izolatları PFGE ile tiplendirilebilir. Diğer restriksiyon endonükleaz enzimine dayalı yöntemlerde olduğu gibi, elde edilen bant paternlerinin tekrar edilebilirliği oldukça yüksektir. Southern blot analizinin her aşamasında belli artefaktlar oluşabilirken PFGE ile elde edilen paternler etidyum bromidle boyanarak basit bir şekilde gösterilebilir. Restriksiyon profilleri göreceli olarak daha basittir ve farklı suşlar arasındaki değişiklikler sıklıkla belirgin şekilde gösterilebilir [146].

PFGE“de yüksek kalitede DNA“nın elde edilmesi oldukça önemlidir. Bu nedenle soğuk tampondaki hücrelerin hızlıca işlenmesi, erimiş agarozla eklemeyen önce bakterilerin buzda tutulması ve agaroz kalıpların soğukta tutulması gerekmektedir [163]. RE seçerken göz önünde tutulması gereken birçok faktör vardır. Birincisi, bakteriyel DNA’nın G+C içeriğidir. Düşük G+C içerikli DNA’lar (örneğin *S. aureus*), tanıma bölgesi G+C bakımından zengin olan RE (örneğin *SmaI*) ile muamele edildiğinde yeteri kadar kesilememektedir. İkincisi ise tanıma bölgesi uzun olan enzimler, kısa olanlara kıyasla daha az sayıda kesim parçaları oluştururlar.

PFGE metodu ve bu metoda ait analizlerin yorumlanması bilgisayar programları vasıtasıyla daha kolay hale gelmiştir. Bu yüzden bu metodun zamanla popularitesi artmıştır. Araştırmacılar PFGE yöntemini bir hastada enfeksiyona yol açan suşlar arasındaki bağı gözlemlemede, hastane içinde ve hastalar arasındaki bulaşmayı izlemede, kontaminasyona ve enfeksiyona neden olan suşları birbirinden ayırmada, bir kişinin enfeksiyonunun yeni enfeksiyon mu yoksa tekrarlayan bir enfeksiyon mu olup olmadığını tespit etmede, salgın durumlarını belirleme ve izlemede, enfeksiyon kaynağını belirlemede kullanılabilmektedir [166]. PFGE çalışmalarında karşılaştırma ve kütüphane metodları olmak

üzere iki method kullanılır. Karşılaştırma methodu, salgın durumlarında kullanılır ve bu yöntemde hedef izolatların tamamı aynı anda çalışılarak birbirleriyle kıyaslanır. Kütüphane yönteminde ise daha önceden oluşturulan parmak izleri (paternler) çalışmalar sonucu elde edilen yeni paternlerle kıyaslanır. Daha çok epidemiyolojik araştırmalarda kullanılır. Mikrobiyoloji laboratuvarları en çok karşılaştırma methodunu kullanırlar [166]. İdeal olarak, bir araştırmadaki örneklerin incelenip sonuçta ortaya çıkan tabloya salgın diyebilmenin PFGE açısından yorumları vardır. Örneğin; araştırmadaki izolatlar köken açısından birbirinden ayrılmaz nitelikte olmalıdır [166]. İzolatların yürütme jeline ait fotoğraf görüntülerine çıplak gözle bakıldığında bile birbirine çok benzerdir. Bant sayılarındaki farklılıklar yok denecek kadar azdır. Standart elektroforezde aynı yönde sabit bir akımla 20 kilobazdan daha büyük parçalar yürütülüp ayrıştırılmazlar [166]. Büyük DNA parçalarının agarozda ayrıştırılmasına etki eden çeşitli faktörler vardır. Bunlardan başlıcaları; agaroz jelin içeriği ve konsantrasyonu, sıcaklık, tampon konsantrasyonu, voltaj, vuruş süresi ve toplam elektroforez süresidir. PFGE’de bazı hata kaynakları yanlış ya da hatalı sonuçlara neden olabilir. Bu hata kaynakları; kontaminasyon, DNA miktarının çok az veya fazla olması, kullanılan saf suyun kalitesi, jeldeki çukurların çaplarına bağlı bantların kayması, iyi görüntü alamama, kullanılan kimyasalların kalitesi, yürütme ısı ve süresinin optimum koşullarda olup olmaması örnek verilebilir [166].

Bir salgından elde edilen epidemiyolojik olarak ilişkili izolatların tanımlanmasında PFGE’nin yüksek etkinlik ve yüksek ayırım gücüne sahip olduğu bilinmektedir [146]. Epidemiyolojik olarak ilişkisiz izolatların ayırımında kullanılan bir tiplendirme yönteminin ayırım gücü, ancak tekrar edilebilirliğin sınırlarını en uygun şekilde gösteren yorum kriterlerinin kullanımıyla ortaya konabilir [167]. Önceleri iki suş, aralarında tek bir restriksiyon parçasının bile farklı olması durumunda ayrı ayrı genotipler olarak kabul edilmekteydi [168,169]. Tenover ve arkadaşları PFGE sonuçlarının yorumlanması için bir sistem önermişlerdir [139].

Bu sistemde bant profillerine bakılarak izolatların birbiriyle olan ilişkileri değerlendirilmektedir. Bu kriterlere göre;

- a) Aynı sayı ve büyüklükte bantlara sahip izolatlar “ayrıt edilemez” olarak,
- b) Üç parçaya kadar farklılık gösteren izolatlar “yakın ilişkili” olarak,
- c) Dört-altı bant farkı gösteren izolatlar “muhtemelen ilişkili” olarak,

- d) Yedi ve üzeri bant farklılığında izolatlar “ilişkısız” olarak kabul edilirler.
- e) Tek bir suş a ait izolatlar da minör farklılıklar birkaç farklı genetik olaya bağı olarak ortaya çıkabilir [139].

Nokta mutasyonu sonucu bir restriksiyon bölgesinde kayıp söz konusu olabilir. Bu durumda iki ayrı parça birleşerek daha büyük tek bir parça olarak görülebilir. Kazanılmış yeni bir restriksiyon bölgesi varsa, bu durumun tam tersi ortaya çıkar. Bu nedenle, iki izolat arasında eğer üç parçaya kadar farklılık varsa yakın ilişkili kabul edilir [146]. Dört-altı parça farklılığında ise iki bağımsız genetik olay söz konusudur. Bu durumda iki izolat birbiriyle muhtemel ilişkili kabul edilir. Yedi veya üzerindeki parça farklılığında ise üç veya daha fazla genetik olay söz konusudur ve izolatlar birbiriyle “ilişkısız” olarak değerlendirilirler [139]. PFGE; *Salmonella* , *Neisseria gonorrhoeae*, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* ,*Escherichia coli* gibi birçok Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterinin tiplendirilmesinde güvenle kullanılmıştır. Vankomisine dirençli enterokoklar, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Acinetobacter* türleri ve *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının tiplendirilmesinde, bu yöntemin ayırım gücünün diğerlerinden daha üstün olduğu belirtilmiştir [14,158].

Özet olarak yöntemin ayırım gücü oldukça yüksektir. Ancak zaman alıcı ve kompleks bir sistemdir. Ayrıca laboratuvarlar arasında hala standardizasyon problemi vardır. Yöntemin uygulanmasında güvenlikle ilgili bazı hususlara dikkat edilmelidir. Bakterilerin işlenmesi aşamasında kontaminasyonu önlemek için azami dikkat gösterilmelidir. Jeli boyamada kullanılan etidyum bromürün güçlü bir mutajen olduğu dikkate alınarak, maske ve eldiven giyilmeli, çevreyi kirletmeden çalışmaya gayret etmelidir [158].

Ribotiplendirme

Ribotiplendirme yöntemi, Grimont ve arkadaşları tarafından bulunup, Stull ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmaktadır [157]. Bu yöntemde ribozomal genlerdeki DNA dizilerindeki değişkenliklerin belirlenmesi prensibine dayalıdır. DNA dizilerindeki bu değişkenlikleri belirlemek için cins, tür veya hedef gruba özel ribozomal RNA’lar birer prob olarak iş görür. Bakterilerde birçok gen tek kopya halinde bulunmakla beraber, ribozomal operon genleri birçok kopya halinde bulunur. Bu özellik yöntemi kolay hale getirir.

Ribotiplendirmede yönteminde öncelikle hedef suşların DNA'sı elde edilir. Elde edilen bu DNA, restriksiyon enzimleriyle kesildikten sonra elektroforezde ayrıştırılır. Daha sonra amaca göre seçilmiş rRNA proba hibridize edilir. Bu yöntemin *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* cinsinden bakterilerin alt tiplendiriminde başarılı olduğu gösterilmiştir [142,170]. Ribozomal operonlar 16S rRNA, 23S rRNA ve ek olarak bir veya daha fazla tRNA'yı kodlayan nükleotid dizilerinden oluşurlar. Bütün stafilokoklar çok sayıda (beş-sekiz) ribozomal operon taşıdıklarından dolayı ribotiplendirme ile tiplendirilebilirler [141,146]. Ribotipler biyolojik olarak çok stabildir ve tekrar edilebilir paternler oluşturular. Ribotiplendirme ve diğer Southern blot analizlerinin performans özellikleri hibridizasyon koşullarının sertliği (stringency), restriksiyon enzimi ve prob seçiminden doğrudan etkilenir. Zaman alıcı ve teknik olarak komplike olan ribotiplendirmede minör bant farklılıklarının ne şekilde yorumlanacağı konusundaki kriterler de henüz standardize edilmemiştir [141]. Bir salgında izole edilen tüm izolatlar genellikle aynı ribotipe sahiptirler. Bununla birlikte ilişkisiz suşların sıklıkla bir veya iki bant farklılığıyla aynı paterni gösterebilmeleri ve epidemiyolojik olarak ilişkili izolatların da benzer minimal değişiklikler gösterebilmeleri nedeniyle bu yöntemin ayırım gücü ve teknik kullanımı sınırlıdır. Bir çalışmaya göre, ribotiplendirme ile altı ribotipe ayrılan izolatlar PFGE ile 26 pulsotipe ayrılmıştır [171]. Ribotiplendirmenin ayırım gücü MEE'den de belirgin bir şekilde daha azdır [141,144]. Ribotipleme stabilitesi ve iyi ayırt ediciliği açısından avantajlıdır fakat yapılan işlemler zaman alıcıdır. Ayrıca her türe özgül enzim kullanılması gerekmektedir [172].

Ribotiplendirme metodunun yaklaşık olarak beş gün sürmesi ve uygulama zorlukları bu alanda tam otomatize sistemlerin geliştirilmesine yol açmıştır. Bu sistemle mikroorganizmanın DNA'sının elde edilmesi, enzimle kesim, elektroforez ve bantların membrana aktarılması, proba hibridizasyon ve görüntüleme basamakları otomatize olarak yaklaşık 8-10 saat gibi oldukça kısa bir sürede tamamlanmaktadır. Otomatize sistemlerde geliştirilen bilgisayar yöntemleri ile bantların karşılaştırılmaları ve suşların tür düzeyinde tanımlanmaları yapılabilmektedir [173].

Southern blotting (Southern Blot Analizi) ve RFLP yöntemleri

Southern blotting yıllardan beri çeşitli prokaryot ve ökaryot organizmaların genomik sıralarını belirlemek için kullanılmaktadır. Hedef geni tespit etmek için DNA(tam

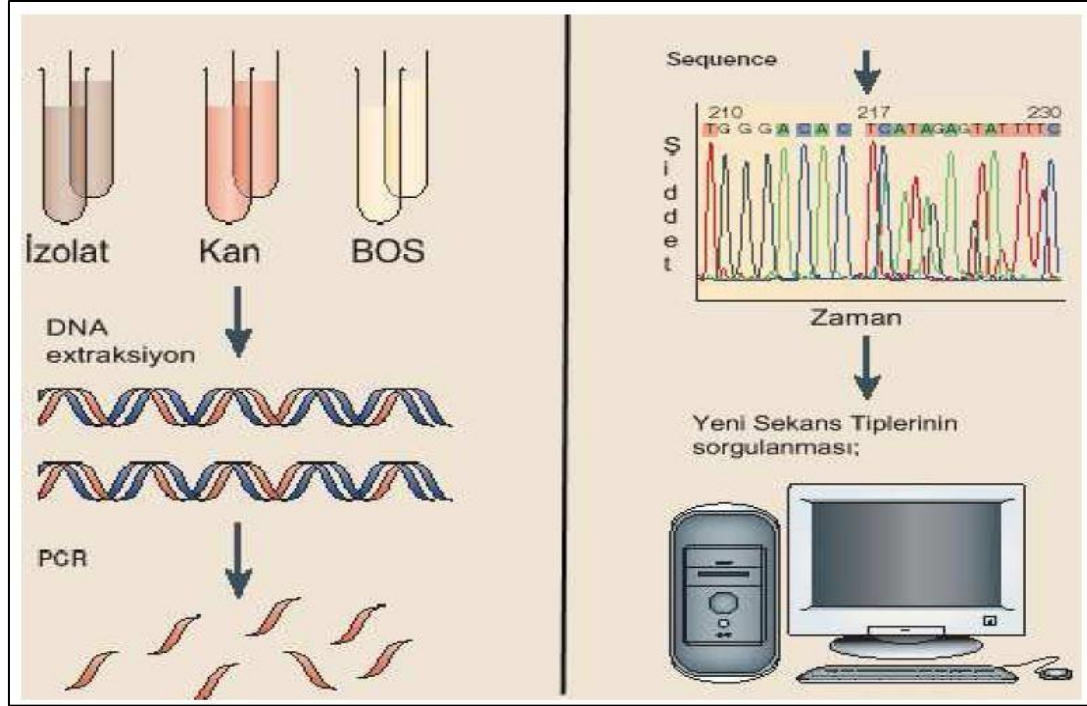
kromozomal DNA) öncelikle bir restriksiyon enzimiyle kesilir. Böylece DNA parçalara ayrılır. Sonra bu parçalar jel içerisinde elektroforez yardımıyla ayrılır. Daha sonra bu parçalar nitroselüloz bir membrana southern blotting yardımıyla aktarılır. Nitrosellüloz membranda nükleik asitler bulunmaktadır. Bu nükleik asitler işaretli ve hedeflenen gen ile homolog bir proba hibridize edilir. Burada esas olan; incelenen özel genetik lokus içinde restriksiyon enzimlerinin tanıdığı yerlerin belirlenmesidir. Bu bölgeler suştan suşa değişkenlik gösterir ve sonuçta birbirine benzemeyen suşlarda bantlar farklı büyüklükte olur. Bu nedenle, tanımlanmış genetik bölgelerdeki restriksiyon enzim yerlerinin lokasyonlarının polimorfik yapıda olduğunu ifade etmek üzere, yönteme “restriksiyon fragment length polymorphism (RFLP)” adı verilmiştir. Bu analizde sadece hedefe uygun problemlerle hibridize olan DNA parçaları görülür haledir. Bu yüzden analizin sonuçlarını değerlendirmek kolaydır. Bu yöntemle, stafilokok, streptokok ve enterokoklar, *Enterobacteriaceae* ailesinin üyeleri, *P. aeruginosa*, *Brucella* spp, *Legionella* spp, *M. tuberculosis* ve *Aspergillus fumigatus*’un alt tiplendirimi yapılmıştır [142,170]. RFLP analizi bakteriyel kromozom ve ekstra kromozomal DNA’nın veya viral genomun (RNA ve DNA) restriksiyon profillerini belirlemede kullanılmaktadır. Yöntem dört temel basamakta gerçekleştirilmektedir. Bunlar; DNA’nın elde edilmesi, restriksiyon enzimi ile kesim, elektroforez ve görüntülenmesidir. Yöntemin en spesifik basamağı, DNA’nın hücre dışına çıkarılması ve saf hale getirilmesidir. Aksi halde enzimler DNA’yı kesemez. Restriksiyon enzimleri (RE), hedef DNA’yı belli noktalardan kesen enzimlerdir. Bin ile 20 bin baz çifti uzunluğundadırlar. *EcoRI*, *HindIII*, *ClaI* ve *HinfI* örnek olarak verilebilir [140]. RFLP yöntemi kolaylıkla uygulanabilen yöntemdir. Ancak enzim seçimi önemlidir. Çok sayıda veya çok yakın bantları değerlendirmek mümkün olmayabilir. Az sayıda mikroorganizma ile çalışıldığında değerlendirme nispeten kolay yapılırken, sayı arttıkça karşılaştırma güçleşmektedir. Bu zorlukları aşmak için karşılaştırılan bantları azaltmak bir yöntem olabilir. Bu amaçla enzimlerle kesilen DNA parçaları jelde yürütülür. Sonrasında jelin üzerine aynı boyutta bir membran konulur. Vakumla jeldeki DNA parçalarının membrana geçmesi sağlanır (Southern blotting). Hibridizasyon basamağında ise, DNA’daki zincirlerden birinin tamamlayıcısı olan tek sarmallı DNA veya RNA problemleri kullanılır. Hibridizasyonu görebilmek için prob’un radyoaktif maddeler (32P) ya da radyoaktif olmayan maddeler (biotin-digoksinin) ile işaretlenmesi gerekmektedir. Sonuçta sadece prob’la hibridize olan DNA parçaları görüleceğinden özgüllüğü artırılmış olur [138].

“Multi locus sequence typing” (MLST)

Bu yöntem, herhangi bir mikroorganizmaya ait lokusların tiplendirilmesinde kullanılır. Oldukça fazla miktarda patojen bakterinin analizinde yaygın biçimde kullanılmaktadır. Antibiyotiklere dirençli klonlar ile virülen klonlar tiplendirilebilmektedir. 1998 yılında Maiden ve arkadaşları genlerin ürünleri yerine canlılığın devamı için gerekli metabolik faaliyetleri sağlayan korunmuş gen bölgelerinin (housekeeping) karşılaştırılmasına yönelik ileri sürdükleri tekniğe MLST denir. Bu teknikte ortalama 500bp uzunluğunda ve yedi adet birbirinden farklı metabolik gen kullanılmaktadır. Bu genlerin dizi analizi yapılarak alleller elde edilmektedir. Her bir allele bir kod verilir. Böylece tıpkı bir kütüphane oluşturur gibi her kökene ait bir dizi tipi saklanır. İlerleyen zamanlarda yapılan analizlerde diğer kökenlerle bu dizi tipleri kıyaslanabilmektedir [175,176].

MLST , bir organizmadaki “yaşamsal faaliyetleri kodlayan” yedi adet gene ait parçaların dizilimleri ile aynı organizmanın farklı suşlarındaki özdeş gen gruplarının karşılaştırılmasını içerir. Bu genlerin, hücrenin temel fonksiyonlarını kodladığı ve kromozomlar üzerine yerleştikleri bilinmektedir. Her bir gen için yaklaşık 450 bp’lik dizi PCR ile çoğaltılır ve dizilenir. Daha sonra karşılaştırmalı dizileme verileri bir dendrogram ile ifade edilir [177]. Bu amaçla *S. aureus* için *arcC*, karbamat kinaz; *aroE*, shikimate dehydrogenase; *glp*, gliserol kinaz; *gmk*, guanilat kinaz; *pta*, fosfat asetiltransferaz; *tpi*, triosephosphate isomerase; ve *yqiL*, asetil koenzim A asetiltransferaz proteinlerini kodlayan genlere ait dizi analizleri yapılmaktadır [157]. Her bir hedef gen dizisi için o diziye özgü bir allel numarası verilir. Yedi lokusta bulunan allel numaralarının birleştirilmesi ile bir “allelık profil” oluşturulur [178]. Bu numaralar “dizi tipi (sequence type, ST)” olarak isimlendirilmektedir. Tek bir nükleotid farklılığı bile suşa yeni bir allel numarası verilmesini gerektirir. İlişkisiz iki izolatin aynı allelik profile olması ise çok düşük bir ihtimaldir. Belirlenen allelik profiller, MLST veri bankasındaki (<http://www.mlst.net>) bilinen allellerle karşılaştırılarak, tespit edilen allel profilinin diğer ülkelerdeki yaygınlık derecesi hakkında bilgi edinilebilir. MLST’nin en önemli avantajlarından birisi de elektronik ortamda saklanabilir verilerin oluşturulabilmesidir. Böylece yeni suşlar eskilerle daha kolay kıyaslanabilmektedir. Klinik uygulamalarda araştırmacılar için bu veriler önemi giderek artan kullanım alanlarına sahiptir. Örneğin bu verilere www.mlst.net adresinden internet yolu ile hızlıca ulaşılabilir [175,176]. Bir

MLST çalışması yapabilmek için öncelikle DNA izolasyonu gerekmektedir. Ardından MLST genleri, PCR yöntemiyle çoğaltılmalıdır. Elde edilen ürünler saflaştırıldıktan sonra dizi analizleri yapılmalıdır. En sonunda sonuçlar bilgisayarda karşılaştırılmalıdır. Şekil 2.4 ve Şekil 2.5’ de MLST analizi özetlenmiştir.



Şekil 2.4. MLST analizinin yapılması [181]

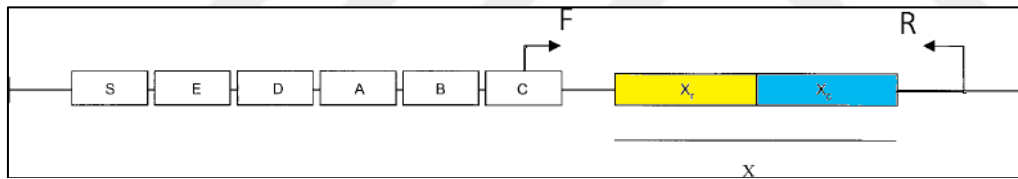


Şekil 2.5. MLST analizi [179]

Sekans tiplerini www.mlst.net web adresinden ulaşılabilir [180]. MLST analizinin çeşitli zorlukları bulunmaktadır. En önemlisi hatasız biçimde 7 alel genin dizilerine ait analizleri yapmaktır. Dizi analizi yöntemi için kullanılan otomatik sistemler yüksek maliyetli sistemlerdir. Bu sistemlerin ekonomik hale gelmesiyle ancak yaygın bir biçimde kullanılabilir [157,180]. Son dönemde ortaya çıkan yeni nesil versiyonları ise ekonomik yönden daha uygundur [175].

spa Tiplendirme

Yöntem, Frenay ve arkadaşlarınca bulunmuştur [181]. *S.aureus* 'a ait Protein A (spa) geni vardır. Bu genin kısa tekrarlayan bölgesi(SSR) veya değişken bölgesi(plimorfik X) vardır. Yöntem bu bölgelerin dizi analizine dayanır. Özellikle polimorfik X bölgesinin değişken 24 bazda bir itekrarı vardır (Şekil2.6). SSR bölgesinin çok çeşitli oluşu nokta mutasyonlarından kaynaklanmaktadır. Çünkü nokta mutasyonlar, bu bölgelerde çeşitli genetik olaylarla(delesyon, duplikasyon) tekrarlayan dizileri etkilemektedir [182].



Şekil 2.6. Proteina A geninin şeması

Kutulardaki gen kodları; S:sinyal dizisi, A-D: immünoglobulin bağlayan bölgeler, E: A-D ile homoloji gösteren bölge, X: polimorfik bölge, COOH terminal bölge, Xr: kısa dizi tekrarları (SSR, 24bp), Xc: hücre duvarına bağlama dizisi [182]

Spa tiplendirme metodunda ilk önce hedef bakteri DNA'sı elde edilir. Daha sonra spa geni(x bölgesi) özel primerler vasıtasıyla ve PCR yöntemiyle çoğaltılır. Sonra bir sekans cihazıyla bu bölgenin DNA dizileri belirlenir. Belirlenen DNA dizilerinin, uygun veri programları(Ridom StaphType) vasıtasıyla spa tiplerinin tanımlaması yapılır [183]. Bu yöntem, MLST yöntemine göre daha kolay uygulanabilir. Bu yöntemde sonuca ulaşabilmek için yalnızca bir bölgenin dizi analizini yapmak yeterlidir. Ayrım yönünden kıyaslırsak MLST ile PFGE arasında bir noktadadır [182].

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) yöntemi

Arbitrary primed PCR olarak da tanımlanan bu yöntemin esası; düşük bağlanma sıcaklıklarında, kromozomal DNA dizilerine yeterli afinite ile hibridize olan 9-10 baz sıralı rastgele primerlerin kullanılmasıdır. Bu rastgele primer bölgeleri yerleşim ve sayıları yönünden bir bakteri türünün değişik suşlarında farklılık gösterir. Sonuçta, agaroz jelde elektroforez ile her bir farklı suş için karakteristik bantlar ortaya çıkar. RAPD ile hemen tüm MRSA'lar tiplendirilebilmekte ve aynı laboratuvar içinde elde edilen sonuçlar tekrarlanabilmektedir [184]. RAPD, bir salgın bölgesinde kullanıldığı zaman epidemiyolojik olarak ilişkili mikroorganizmaları sınıflandırabilir ve ilişkisiz olan izolatları ayırabilir [184,185]. Bu yöntemin en belirgin avantajı diğer yöntemlere göre oldukça hızlı sonuç vermesi, teknik olarak basit olması ve tiplendirilecek mikroorganizma ile ilgili genom bilgisine ihtiyaç göstermemesidir [185].

Ayrım gücü kullanılan primerlerin baz dizilimine ve sayısına bağlıdır. Ancak üç veya daha fazla primer kullanılması hem zaman alıcıdır, hem de bu şekilde bile ayrım gücü PFGE'den daha düşüktür [186]. Farklı merkezlerde yapılan yarı standardize yöntemlerden alınan sonuçlar karşılaştırıldığında, MRSA'lar için RAPD yönteminin tekrarlanabilirliğinin çok zayıf olduğu görülmüştür [184]. Bunun nedeni zayıf bantları yorumlamadaki güçlük veya bant ayırımını ve farklılığını etkileyen elektroforez koşullarındaki değişiklikler olabilir. Aynı laboratuvar da bile farklı zamanlarda yapılan RAPD tiplendirme sonuçları arasında değişiklikler olabilmektedir. Tekrarlanabilirliğin düşük olması ve laboratuvarlar arası standardizasyonun zor olması nedeniyle RAPD uygun bir referans yöntem değildir [184]. Fakat bölgesel olarak endemik olduğu bilinen bir suş için spesifik primerlerin kullanımıyla hızlı bir tarama testi olarak kullanılabilir.

coa (Koagülaz) tiplendirme yöntemi

S.aureus suşlarının karakteristik özelliklerinden biri olan koagülaz üretimi, tiplendirmede kullanılabilen önemli kriterlerdendir. Koagülaz tiplendirme yöntemi, koagülaz genindeki spesifik segmentlerdeki çeşitliliğe bağlı olarak geliştirilmiştir. 3' bölgesinde sayısı 4 ile 8 arasında değişen 8'li baz çiftlerinden oluşan tekrarlar serisi yer alır. Koagülaz enzimine ait coa gen bölgesinin PCR ile amplifiye edilmesi sonucu oluşan amplifiye ürünü AluI gibi restriksiyon enzimleri ile kesilir. Elde edilen kesim ürünlerinin jel elektroforezi ile

ayrılanması sonucu var olan restriksiyon bölgelerinin sayısına bağlı olarak çeşitli büyüklükte 4'ten fazla bant oluşur. Ortaya çıkan restriksiyon parçalarının büyüklük polimorfizmindeki farklara bağlı olarak değerlendirilme yapılır [157]. Ancak bu yöntemde, restriksiyon enzimleri ile PCR ürünlerinin kesimi için uygun inkübasyon süreleri ve sıcaklık koşullarının optimizasyonu, ayrıca elektroforez sırasında kullanılacak akım ve sürelerinin optimizasyonu gibi ön çalışmalar gereklidir. Koagülaz geninin PCR-RFLP ile incelenmesi PFGE yöntemiyle karşılaştırıldığında daha düşük bir ayırım gücüne sahip bulunmuştur [187,188]. Ancak bu dezavantajına karşılık daha hızlı ve daha düşük maliyettedir. Ayrıca bant sayısının az olması farklı laboratuvarların elde ettikleri sonuçları karşılaştırmayı kolaylaştırmaktadır. Ayırım gücünün artırılması için farklı bir RE enzimi kullanımı veya birden fazla enzimin kombine kullanımı gibi denemeler başarıya ulaşmamıştır. Koagülaz tiplendirme yönteminin, epidemik ve sporadik MRSA izolatlarını birbirlerinden ayırmak amacıyla kullanılması önerilmektedir [189].

SCCmec yöntemi

SCC, stafilokok türleri arasında genetik madde alışverişine aracılık eden hareketli bir elemandır. Yapı olarak patojenite adasına benzemekle birlikte hiç virulans geni içermemektedir. MRSA suşlarının en belirleyici özelliği Staphylococcal Casette Chorosome *mec* (SCC*mec*)'e sahip olmalarıdır. Bu hareketli genetik eleman *mecA* geni tarafından kodlanan geniş spektrumlu betalaktam direnci için önemli bir belirleyicidir. Metisilin dirençli stafilokok suşlarının ortaya çıkması duyarlı suşların kromozomlarına SCC*mec* elemanlarının aktarılması yolu ile olmaktadır. SCC*mec* elemanları oldukça farklı yapısal organizasyonu ve genetik içeriği ile tip ve alt tiplere ayrılmıştır. Günümüzde MRSA klonları yaygın olarak pratikte SCC*mec* tipi ve kromozomal yapısına dayanan sekans tipleri ile tanımlanmaktadır [190].

Metisiline duyarlı *S.aureus* (MSSA) kökenlerinin, metisilin direncinden sorumlu *mecA* geni taşıyan SCC*mec* gen kasedini kazanmaları ile metisiline dirençli hale geldikleri (MRSA) gösterilmiştir [191] Oliveira ve arkadaşları, geliştirdikleri multiplex PCR yöntemi ile SCC*mec* tiplendirmesinde zaman ve iş gücü açısından önemli bir kolaylık sağlamışlardır [192].

Yapılan çalışmalar, son yıllarda giderek daha önemli bir sorun haline gelen toplumdan kazanılmış MRSA infeksiyonlarından izole edilen kökenlerin çoğunlukla tip IV ve Tip V SCCmec taşıdıklarını ortaya koymaktadır. SCCmec sınıflandırılmasıyla bu kökenlerin hastane kaynaklı kökenlerden ayırımı yapılmakta ve toplum içinde yayılım haritaları çıkartılmaktadır [192]. Bugün için MRSA kökenlerinin genotiplendirilmesinde SCCmec tiplendirmenin, diğer yöntemlerle (PFGE, MLST gibi) birlikte kullanımı, ayırım gücünü önemli ölçüde yükseltmiş, ayrıca MSSA olup SCCmec kasedini edinerek MRSA fenotipine dönen kökenlerin evrimsel gelişiminin izlenmesini mümkün kılmıştır [176,193,194].

Rep-PCR yöntemi

Bu yöntem kromozom üzerindeki farklı sayı ve pozisyonlardaki tekrarlanan dizilere uyan primerlerin kullanıldığı bir PCR yöntemidir. PCR işlemi belirli bölgelere spesifik primerlerle yüksek sertlikte (high stringency) gerçekleştirilir [195]. Bu yöntemin tekrarlanabilirliği RAPD'den daha iyidir. MRSA'ların tiplendirilmesinde hangi primer kullanıldığında bu yöntemin daha başarılı olabileceği henüz tam açıklık kazanmış değildir [196]. Son yıllarda iki yeni moleküler tiplendirme yöntemi daha uygulama alanına girmiştir. Bunlar; "cleavase I" adlı termostabil bir endonükleazın kullanıldığı "cleavase fragment length polymorphism (CFLP)" yöntemi ile restriksiyon enzimleriyle elde edilen DNA parçalarının selektif amplifikasyonuna dayanan bir parmak izi tekniği olan "amplified fragment length polymorphism (AFLP)" dir [14].

Mikrobiyal organizmaların tiplerinin belirlenmesinde ve identifiye edilmelerinde birtakım temel ve özel testler/yöntemler ortaya konulmuştur. Fakat bakterilerin moleküler düzeyde tiplendirilmelerinin yapılması son zamanlarda yeni ve ileri tetkikler olarak dikkat çekmektedir. Bu bakımdan en belirgin olan ön yöntemlerinden FİGE, TAFE, OFAGE şeklinde olup bu yöntemlerin geliştirilmesiyle organizmaların moleküler tiplendirilmesindeki en güvenilir ve en son kullanılan yöntem PFGE yöntemi kabul edilmektedir. İşte biz de yapılan literatür taraması eşliğinde *Staphyococcus aureus* suşlarının PFGE tekniği ile moleküler ilişkilendirilmesi konusu belirlenerek tez araştırılması olarak yapılması öngörülmüştür. Yapılan tez, Türkiye'de *Staphyococcus aureus* suşlarının moleküler tiplendirilmesinde PFGE metodu kullanılarak gerçekleştirilen tezler arasında öncü niteliğindedir. Ayrıca elde ettiğimiz sonuçlar, çarpıcı nitelikte olup 5. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi'nde(28 Ekim-1 Kasım 2019) sunulmuştur ve bilim insanlarıyla paylaşılmıştır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışmamızda Ahi Evran Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi ve Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı'na bağlı laboratuvarlardan faydalanılmıştır. Çalışmamızda 1 MRSA, 59 MSSA suşu olmak üzere toplam 60 *S.aureus* izole edilmiştir. 2010-2014 yılları arası bu *S.aureus* suşlarının birbirleriyle olan epidemiyolojik ilişkisini ortaya koymak için PFGE yapılmasına karar verilmiştir. Bu çalışma, müracaat edenlerden daha önce elde edilen biyolojik numune tabanlı suşların kullanılması ile gerçekleştirilen konstrüktif bir çalışmadır.

3.1. Deney Grubu

Bu tez çalışmasında Ahi Evran Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesine 2010-2014 yılları arasında başvuran hastaların çeşitli numune örneklerinden standart konvansiyonel yöntemlerle izole edilmiş, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı'na bağlı laboratuvarların kültür koleksiyonlarında saklanan 55 hastaya ait 60 adet *Staphylococcus aureus* suşu kullanılmıştır. *S.aureus* suşlarının tür tayinin doğrulaması Maldi-Tof yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu suşların antimikrobiyallere duyarlılıkları disk difüzyon metodu ile EUCAST 2019 önerileri doğrultusunda yapılmıştır. *S.aureus* suşlarının PFGE tekniğiyle moleküler tiplendirilmesi ise Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı'na bağlı Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Merkez Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

S.aureus insan vücudunda fırsatçı patojen olması, doğada yaygın bulunması, insanlarda sık rastlanan enfeksiyonlara neden olması ve antibiyotiklere direncinin sürekli artması gibi sebeplerden dolayı tez konusu olarak seçilmiştir. PFGE tüm genomu hedefleyen iyi bir altın standart ve moleküler teknik olması nedeniyle bu deney grubu laboratuvar çalışmalarında kullanılmasının bilimsel fayda ve çıktılar sağlayacağı düşünüldüğü için kullanılmıştır.

3.2. Gerekli Cihazlar

Tez çalışmamızda suşların türlerinin doğrulanması için MALDI-TOF MS cihazı, bakteri yoğunluğunu ayarlamak için spektrofotometre, gerekli solüsyon ve besiyerlerinin pH'ını ayarlamak için pH metre, kullanılan kimyasalları ölçmek için hassas terazi, solüsyon hazırlamak için vorteks ve manyetik ısıtıcı, karıştırıcı, PFGE yapılması için PFGE cihazı (CHEF DR III) ve bağlı üniteleri, elektroforez tankı ve güç kaynağı, jel görüntüleme cihazı kullanılmıştır.

- Spektrofotometre
- Benmari su banyosu
- pH metre
- MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics) cihazı
- PFGE cihazı (CHEF DR III) ve bağlı üniteleri
- Elektroforez tankı ve güç kaynağı
- Jel görüntüleme cihazı
- Görüntü analizi için yazılım
- Hassas terazi
- Vorteks
- Manyetik karıştırıcı ve ısıtıcı
- Yatay çalkalayıcı
- Santrifüj
- Etüv
- Buzdolabı
- Mikrodalga fırın

3.3. Gerekli Solüsyonlar

PFGE yapılması için EDTA, TBE, Gel Loading Buffer, Tris, TE Buffer, HST, Lizis solüsyonu 1 ve 2, Sarkozil solüsyonları kullanılmıştır.

3.3.1. Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA)

186,1 gr Etilen diamin tetra asetik asit (H_2O -Disodium EDTA) tartılıp bir balonjojeye konur. Üzerine 800 ml distile su ilave edilir. Daha sonra balonjoje manyetik karıştırıcıya alınarak bu karışımın eritilmesi sağlanmıştır. Sonraki aşamada NaOH ile pH ayarlaması yapılmıştır. pH 8 'e ayarlanınca toplam hacim 1 lt'ye tamamlanmıştır. Son aşamada 121 °C'de otoklavda 15 dk sterilizasyon yapılmıştır.

3.3.2. TBE (EDTA, Tris, Borik Asit) pH:8.0

10x TBE solusyonu (Stok)

121,1 g Tris Base, 61,83 g borik asit ve 5,84 g EDTA tartılır. Bir balonjojeye konuldu.. Distile su ile toplam hacim 1000 ml'ye tamamlandı. Otoklavda 15 dk 121 °C'de sterilizasyon yapıldı. Son aşamada solüsyonun pH'sı 8.0'e ayarlanarak solüsyon +4 °C'ye kaldırıldı.

0,5x TBE yürütme solusyonu

50 ml 10x TBE stok solüsyonundan alındı. Üzerine 950 ml distile su ilave edildi. Böylece 1000 ml 0,5 x TBE yürütme solüsyonu da hazırlandı.

3.3.3. Gel loading buffer (6X)

25 mg bromfenol mavisi, üzerine 4 g süktroz ve 10 ml su ilave edilerek solusyon hazırlandı. Ayrıca bu buffer solüsyon hazır biçimde ticari olarak da temin edilebilir.

3.3.4. Tris (1M)

Tris Base, 800 ml distile suda eritilip, yaklaşık olarak 60 ml HCl asit ilave edilerek pH: 7,6'ya ayarlanarak karışım 1000 ml'ye tamamlandı. 121 °C'de 15 dk otoklav ile sterillendi.

3.3.5. 1M NaCl

58,44 g NaCl tartılıp bir balonjojeye konularak üzerine 800 ml civarında distile su konuldu. NaCl, distile su içinde çözüldükten sonra toplam hacim 1000 ml' ye tamamlandı.

3.3.6. TE buffer (10mM tris+ 1mM EDTA)

Bir balonjoje içerisine 10 ml Tris (1M) ve üzerine 2 ml 0,5 molar EDTA konuldu. Daha sonra hacim toplamda 1000 ml olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

3.3.7. Hücre süspansiyon tamponu (HST) (pH: 7,2)

1,576 g Tris-HCl, 18,61 g EDTA (0,5 M) ve 1,17 g NaCl hassas terazi le tartılıp bir miktar distile su içerisinde eritildi. Daha sonra toplam hacim 1000 ml olacak şekilde distile su ile hacim ayarlandı. Son aşamada pH: 7,2'ye ayarlandı.

3.3.8. Lizis 1 solusyonu (pH:7,2)

0,788g tris hidroklorür(Tris-HCl), 1,461g bir molar sodyum klorür(NaCl), 9,306g 0,5 molar etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) ve 1 g deoksikolat, 2,5 g sarkozin (N-Lauroylsarcosine sodium salt) tartılıp bir balonjojeye konuldu. Ultra saf su ile son hacim 1000 ml olacak şekilde tamamlandı.

3.3.9. Lizis 2 solusyonu

250 milimolar 18,612 g etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), 5g sarkozin tartılıp bir balonjojeye konur. Üzerine son hacim 100 ml olacak şekilde ultra saf su ilave edildi. EDTA küçük hacimlerde çözünmesi zor bir kimyasal madde olduğu için sodyum hidroksit(NaOH) pelletleri çözeltinin pH'sı 9,0'a ulaşana kadar kullanıldı. Her örnek solüsyonuna ml başına 50 µg Proteinaz K eklendi.

3.3.10. Sarkozin (%10)

5 gr sarkozin, 50 ml distile su içerisinde karıştırılarak solüsyon hazırlandı.

3.4. Gerekli Besiyerleri

Suşlarımızın canlandırılması amacıyla koyun kanlı agar besiyeri kullanılmıştır. PFGE de saf kültür için tripton soy broth agar kullanılmıştır. Mller Hinton agar (MHA) besiyeri de antibiyotiklere olan dirençlilik ve duyarlılıkların belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır.

3.4.1. Kanlı agar

Kanlı agar besiyerinin pH'sı 7,4'e ayarlanan kanlı agar besiyeri 15 dk otoklav içerisinde 121°C'de sterilize edildi. Besiyerimiz daha sonra 50 °C'ye kadar soğutuldu. Soğutma işlemi tamamlanınca içerisine sterillenmiş koyun kanı (%7) ilave edildi ve petri kaplarına döküldü.

3.4.2. Mueller- hinton agar (MHA)

MHA besiyerimizin pH' sı 7,3'e ayarlandı. Daha sonra 121°C'ye ayarlı otoklavda 15 dk sterilize edildi. Sterilizasyondan sonra 50 °C' ye kadar soğutuldu ve petri kaplarına döküldü.

3.4.3. Brain hearth infusion broth (BHIB) (%20 gliserinli)

Karışımın pH' sı 7,4'e ayarlandı. Daha sonra besiyeri içeriğimiz 121°C'ye ayarlı otoklavda 15 dk sterilize edildi. En sonunda 0,5 ml miktarda ependorf tüplere dağıtıldı.

3.4.4. Tryptone soy broth (TSB) (%7,5 Tuzlu)

Karışımımızın pH' sını 7,4'e ayarlayıp otoklavda 121°C'de 15dk sterillendi. Daha sonra her tüpte 5 ml olacak şekilde tüplere dağıtıldı.

3.5. Gerekli Reaktifler

- Lizostafin- (Sigma / Almanya) : 10 mg/ml (steril distile su içinde)
- Lizozim- (Serva / Almanya) : 10 mg/ml (steril distile su içinde)
- Proteinaz K- (AppliChem / Almanya) : 20 mg/ml (steril distile su içinde)

- “Low Melting” Agaro- (Sigma / Almanya) : %1,5 (sterile distile su içinde, w/v)
- “Pulsed-field Certified” Agaro- (BIO-RAD / ABD)
- *SmaI* restriksiyon enzimi- (TaKaRa / Japonya) : 10 IU/µl

3.6. Kullanılan Antibiyotikler

- Ampisilin,
- Eritromisin,
- Tetrasiklin,
- Klindamisin
- Siprofloksasin
- Trimetoprim
- Sulfametoksazol
- Amoksisilin
- Klavulanik asit
- Fusidik asit
- Amikasin
- Gentamisin
- Eifampin
- Sefalotin

3.7. Yöntem

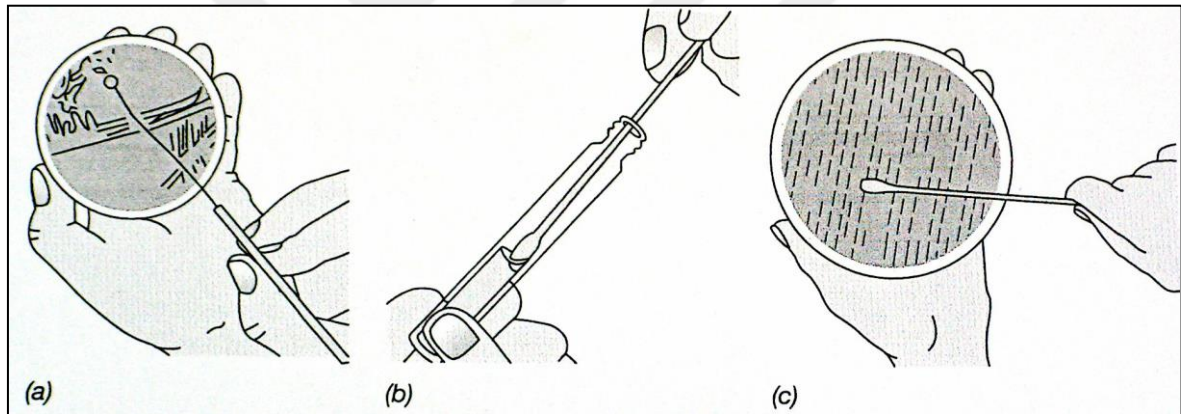
3.7.1. Suşların MALDI TOF MS ile doğrulanması

Çeşitli klinik örneklerden konvansiyonel yöntemlerle izole edilmiş, -80°C’de derin dondurucuda %16’lık gliserinli buyyonda saklanmış *S.aureus* suşları oda ısısında bekletilerek suşların çözülmesi sağlandı ve daha sonra kanlı agara ekim yapıldı. 24 saat inkübe edilmiş *S.aureus* plaklarından uygun koloniler koloni seçilerek MALDI plağına (MTP 384 polished steel target, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) 1 µL öze ile spot yayma yapıldı. Üzerine 1 µL matriks (alfa-cyano-4 hidroksicinnamic asit) solüsyonu eklenip kristal oluşumu görüldü. *S.aureus* suşlarının identifikasyon doğrulaması, MALDI-Biotyper 3.0 veritabanı yazılımı (versiyon 3.1.2.0; BrukerDaltonik, Almanya) ile üreticinin önerdiği sınır değerleri (cins ≥ 1.7 and tür ≥ 2.0) kullanılarak yapıldı.

3.7.2. Antibiyotik duyarlılık deneyi

Klinik kültürlerden izole edilen *S. aureus* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon tekniği ile Eucast'ın önerileri dikkate alınarak, Mueller Hinton Agar besiyerinde, standartlara uygun olarak yapıldı.

Duyarlılık testi yapılacak bakteri suşları, taze katı plak kültürlerinden birer koloni alınarak tryptic soy broth (TSB) içeren tüplere ekim yapıldı. Tüpler, 37°C'de, yaklaşık 3 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda bakteri süspansiyonlarının bulanıklığı, 0.5 Mc Farland bulanıklığına eşdeğer olacak şekilde hazırlandı. Pamuklu, steril eküvyonlar ile tüplerdeki bakteri süspansiyonları, 4 mm kalınlıkta hazırlanmış olan steril MHA besiyeri yüzeyine homojen olarak yayıldı (Şekil 2.7).

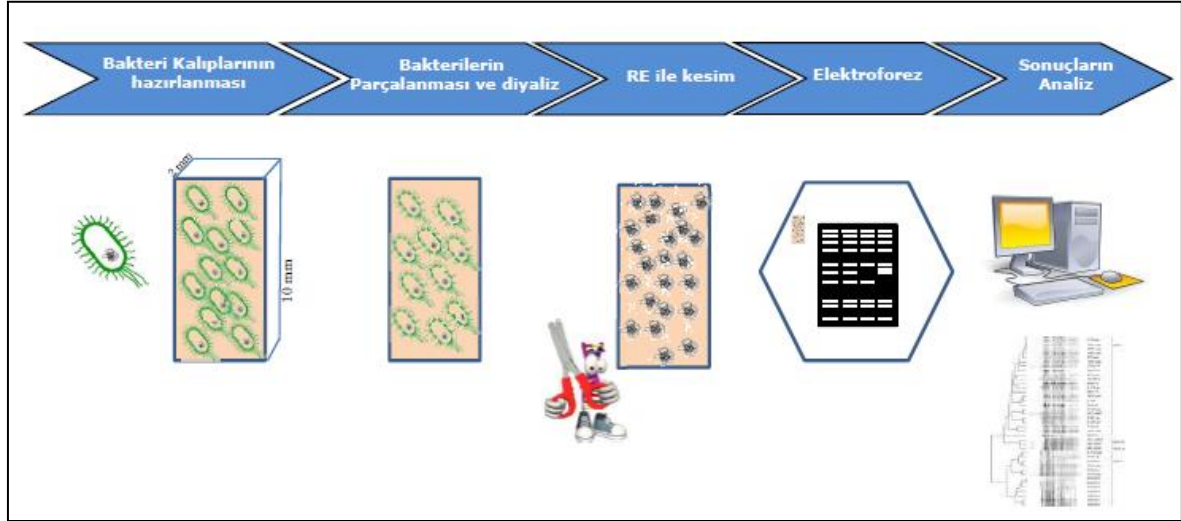


Şekil 3.1. MHA besiyerine ekim [187]

Besiyerlerinin yüzeyi kuruduktan sonra antibiyotik solüsyonları emdirilmiş ticari diskler yerleştirildi. Kullanılan diskler, disk içerikleri yukarıda verilmiştir. Diskler arasında ortalama 25 mm, petri kenarına da en az 10 mm mesafede olacak şekilde konumlandırıldı. 18-24 saat süreyle 37° C' de inkübasyonun devamında her bir antibiyotik diski etrafında oluşan inhibisyon zon çapları kumpas yardımıyla milimetrik olarak ölçüldü ve sonuçlar not edildi [187].

3.7.3. PFGE yapılıması

Yöntemin ana basamakları



Şekil 3.2. PFGE yönteminin basamakları [197]

A- izolatların hazırlanması

1. Canlandırma: İlk iş olarak *S.aureus* suşları, canlandırılmak amacıyla kanlı agara pasajlandı. 18-24 saat inkübasyonda bekletildi.
2. Saflaştırma: İnkübasyon süresi bitiminde suşlar incelenerek içerisinde tek koloni halinde saf olarak üreyenler belirlendi. Daha sonra bu tek koloniler triptik soy agara, tek koloni pasajı yapılarak yine 18-24 saat inkübasyona bırakıldı.
3. İnkübasyon süresi bitiminde suşlarımız saf kültür içeren koloniler halinde üretildi. Bu koloniler plastik öze ile toplandı ve içerisinde 1ml hücre süspansiyon tamponu (HST) bulunan steril cam tüplere aktarıldı.



Resim 3.1. Saf kültür halinde üreyen *S.aureus* 'ların hücre süspansiyon tamponu içinde süspansiyon edilmesi [197]

4. Hücre süspansiyonu, 13.000 x g' de, 4 ° C' de, 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üstteki süpernatant atıldı.
5. Pelletin üzerine tekrar 1 ml soğuk hücre süspansiyon tamponu eklenerek kısa süreli vorteks yapıldı.
6. Bakteri yoğunluğu, spektrofotometreyle 590 nm' de 1 absorbans (yaklaşık McFarland 4 bulanıklığı) olacak şekilde ayarlandı.

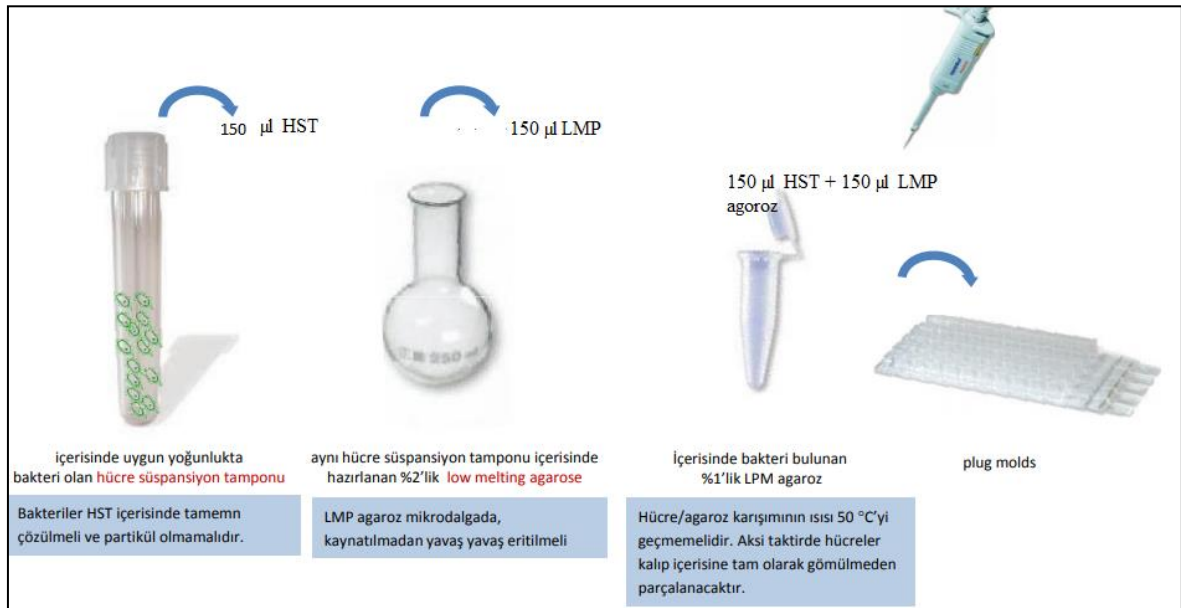


Resim 3.2. Bakteri yoğunluğunun spektrofotometrede ayarlanması [197]

B- suşların agaroz gömülmesi

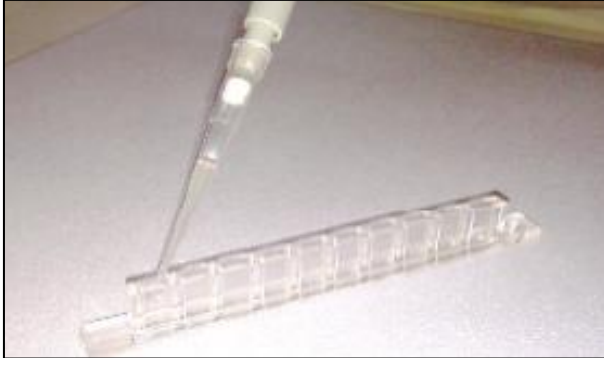
1. Hücre süspansiyon tamponu içerisinde low melting agar(% 2' lik) hazırlandı.

- 0.20 gr low melting agar üzerine 10 ml HST, yavaşça karıştırılarak ağarın erimesi sağlandı.
 - Low melt agarozun çözülmesi çok önemlidir. Bu çözülmenin kaliteli bir şekilde sağlanması için kısa süreli mikrodalga fırında tutuldu ve daha sonra agarozu içeren balonjoje 50 ° C' lik su banyosuna konuldu.
2. Agaroz kalıbı, içerisine konulacak agar ve suş kalıbının rahat şekil alması için içerisinde buz parçacıkları olan buz kabına konuldu.
 3. HST içinde hazırlanmış bakteri süspansiyonundan 150 µl alındı ve üzerine 2 µl lizostafin (1 mg/ml distile) eklendi. Hücre-enzim karışımına, 50 ° C' de tutulan düşük erime ısılı agarozdan 150 µl eklenerek iki üç sefer pipetajlama yapıldı.



Resim 3.3. *S.aureus* kalıplarının hazırlanması [197]

4. Homojen haldeki low melt agaroz ve bakteri karışımından 100 µl alındı ve hava kabarcığı olmadan agaroz kalıbına aktarıldı.
5. Kalıplar, katılaşması amacıyla + 4 ° C' de, 10 dakika bekletildi.



Resim 3.4. Hücre/agaroz karışımının kalıplara pipetlenmesi [197]

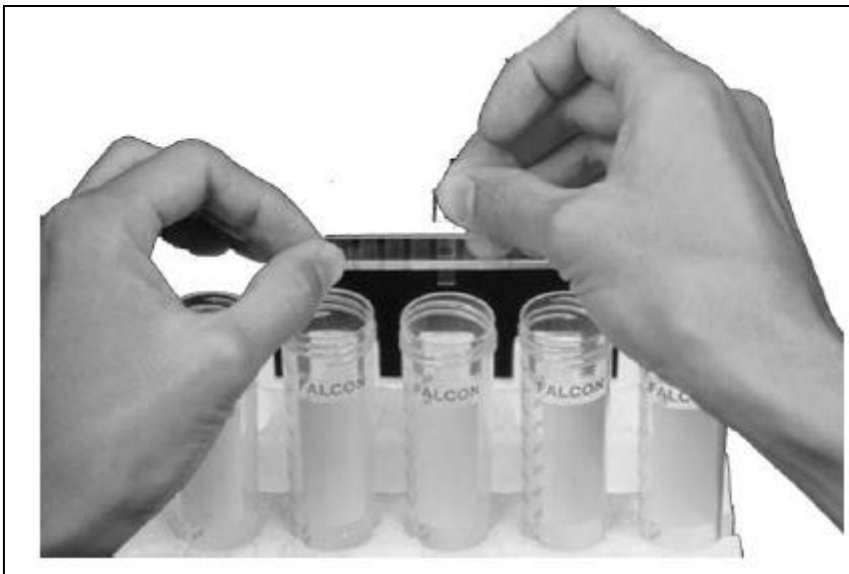
C- agaroz içindeki hücrelerin parçalanması

1. 5 ml'lik steril kapaklı tüplere 0.5 ml hücre lizis solüsyonu konuldu.

6 ml hücre lizis solüsyonunun hazırlanması;

10 x hücre lizis solüsyon-1 ' den 600 μ l alınarak üzerine 5400 μ l steril distile su eklendi.

2. Agaroz ve bakteri birleşiminden oluşan agaroz kalıp, yatağından steril öze yardımıyla çıkarıldı ve içerisinde hücre lizis solüsyonu yer alan steril ve şeffaf cam tüplere yerleştirildi.



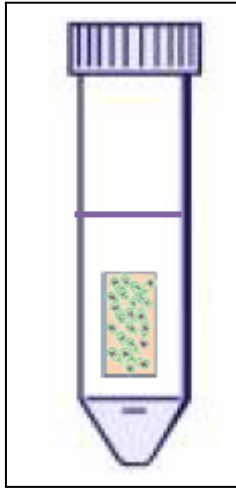
Resim 3.5. Bakterilerin kalıptan çıkarılarak lizis solüsyonuna yerleştirilmesi [197]

3. Benmari su banyosunun sıcaklığı 37 ° C'ye ayarlandı ve kalıplar 1 saat çalkalamalı su banyosunda bekletildi.
4. Kalıpların bekletildiği cam tüplerden hücre lizis solüsyonu kalıplara zarar vermeden döküldü. Yerine 0.5 ml Proteinaz K konuldu ve yarım saat çalkalamalı su banyosunda bekletildi.(50 ° C')

6 ml proteinaz K solüsyonunun (50 µg/ml proteinaz K) hazırlanması

Proteinaz K (10 mg/ml) enziminden 30 µl alınıp üzerine 5970 µl ES çözeltisi (250 Mm EDTA- % 1 sarkozin) ilave edildi.

D- agaroz kalıpların yıkanması

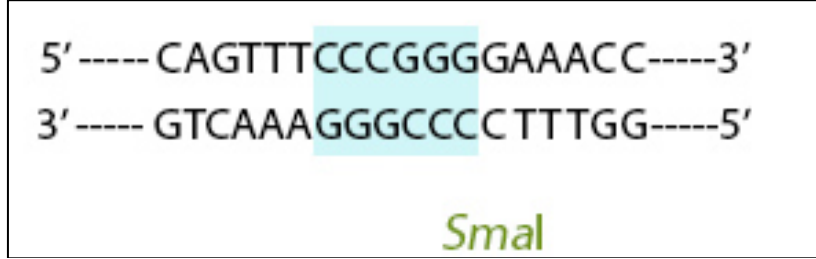


Resim 3.6. Agaroz kalıpların TE ile yıkanması [197]

1. Agaroz kalıplarının katılaşması için içerisinde kalıpların bulunduğu cam tüpler +4 ° C' de 15 dakika bekletildi.
2. Dikkatlice Proteinaz K solüsyonu aspire edildi.
3. Daha sonra agaroz kalıpları üç defa (her biri 50 ° C' de 30 dakika olmak üzere), 4 ml TE tamponuyla yıkandı.
4. Böylece içinde saflaştırılmış DNA bulunan agaroz, restriksiyon enzimi ile kesime hazır hale getirilmiş oldu.

E- agaroz kalıpları içindeki DNA'nın RE ile kesilmesi

1. DNA içeren agaroz kalıbı bir lam üzerine alındı. Agar kalıbı bir bistüri ile $\frac{1}{4}$ oranında kesildi. Kesilen parça 100 μ l 1x SmaI tamponu içine konularak benmari su banyosunda 30 ° C' de 10 dakika bekletildi. Sonra sıvı aspire edildi.



Resim 3.7. Agoroz kalıpları içindeki DNA'nın SmaI enzimi ile kesilmesi

2. Her agaroz kalıbı için aşağıdaki karışım hazırlandı;

10x SmaI tamponundan 10 μ l alınıp üzerine SmaI enziminden (10 U/ μ l) 2.5 μ l ilave edildi. Daha sonra 87,5 μ l steril saf su ile toplam hacim 100 μ l 'ye tamamlandı.

3. Bu karışımın içerisine, enzimin tamponu ile yıkanmış agaroz kalıbı konularak çalkalamalı su banyosunda 30 ° C' de 2 saat inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonunda tüpler buzdolabında 15 dakika bekletildi.
5. Kalıplar elektroforez için hazır hale getirildi.

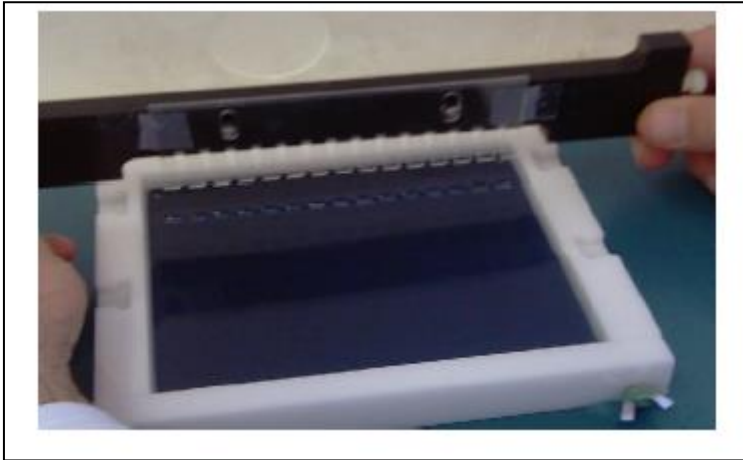
F- elektroforez jelinin hazırlanması ve kalıpların jele yüklenmesi

- 0.5 x TBE içinde 100 ml olacak şekilde % 1' lik agaroz hazırlandı. Burada kullanılan agaroz PFGE için özel üretilmiş sertifikalı agarozdur.
- 1 gr agaroz 200 ml' lik balona konuldu ve üzerine 100 ml 0.5 x TBE eklendi.
- Balonjojenin ağzına aliminyum folyo kapatıldı. Balonjoje, 60 saniye ve ikinci turda 15 saniye olmak üzere iki sefer mikrodalga fırında tutuldu.
- Daha sonra balonjoje 50 ° C' lik benmari su banyosuna konuldu.



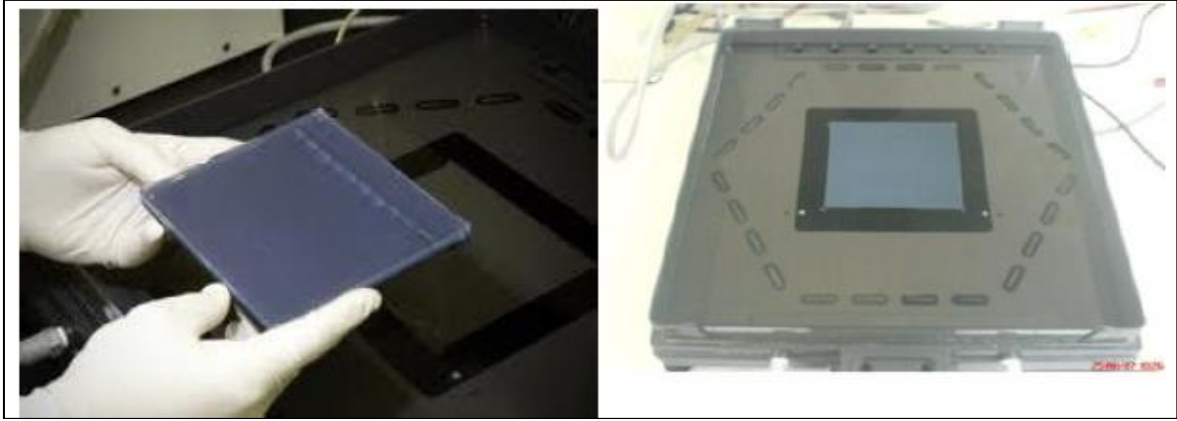
Resim 3.8. PFGE sertifikalı agaroz kalıpların hazırlanması [197]

1. Agaroz dökülecek kaset hazırlandı, sızdırmaması için etrafı bantlandı. Su terazisi ile tamamen düzgün olduğu kontrol edilmiş bir zemine konuldu.
2. RE ile kesilmiş olan agaroz kalıplarının her biri 15 dişli tarağın dişlerinin uç kısmına (tarağın uç çizgisine tam paralel olacak şekilde) yerleştirildi. Tarağın iki kenar ve ortasındaki dişlerine kontrol suşuna ait kalıplar yüklendi.



Resim 3.9. Agaroz kalıpların jel içine yerleştirilmesi [197]

3. En fazla 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra örnek konulan kısım DNA'nın yürüyeceği yöne gelmek kaydıyla tarak agaroz dökülecek kaset içerisine yerleştirildi.
4. 50 ° C su banyosundaki agaroz dikkatli bir biçimde hava kabarcıkları oluşturmadan kaset içine yavaşça ama kesintisiz olarak aktarıldı.
5. Kasetteki agarın jel biçiminde donması için 22 ° C'deki odada yarım saat katılaşmaya bırakıldı. Daha sonra kalıp tarağı tek hamlede çıkarıldı.
6. Süre bitiminde agaroz kasetinin çerçeveleri çıkarıldı. Kaset içerisindeki jel, içerisinde 2lt. 0.5 x TBE. tamponu bulunan PFGE tank yatağına yerleştirildi.



Resim 3.10. PFGE tankına yükleme [197]

G- elektroforez

CHEF- DR III sisteminde (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium) uygulanan elektroforez koşulları:

Başlangıç vuruşu 5,3 saniye,

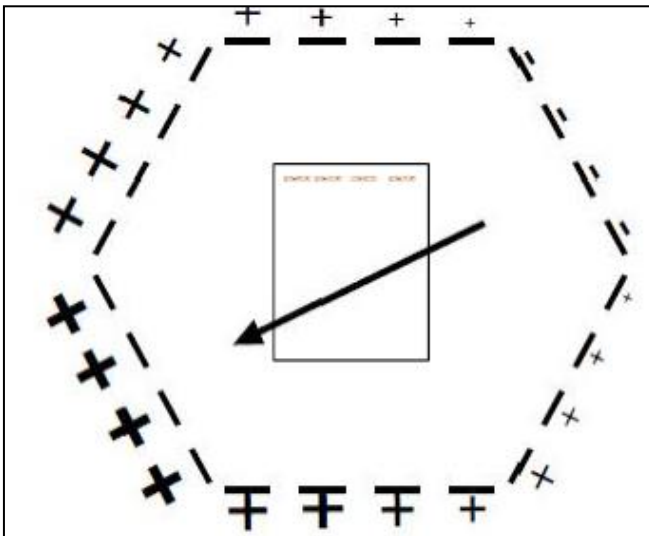
Bitiş vuruşu 34,9 saniye,

Vuruş açısı 120° ,

Akım 6 V/cm^2 ,

Sıcaklık 14° C ,

Süre 20 saat.



Şekil 3.3. CHEF- DR III sistemi

H- sonuçların analizi

1. Elektroforez tankında yürütmesi tamamlanan jel , içerisinde mililitresinde 5 l etidyum bromür içeren toplam hacmi 400 ml olan saf su içine konuldu ve yarım saat boyandı. Bu alışmalar her bir jel için 3 defa tekrar edildi.
2. Daha sonra görüntüleme cihazında fotoraflamalar yapıldı.



Resim 3.11. Sonuçların görüntülenmesi [197]

3. Gel logic 2200 imaging system (ayırım gücü:1780x1280 piksel, Kodak Company, NY, USA) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekildi. Çekilen fotoğraflar TIFF formatında kayıt edildi.
4. GelCompar II yazılım sistemi (versiyon 3.0, Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Beigium) kullanılarak bant profilleri analiz edildi. Öncelikle her fotoğrafta bulunan üç adet standart (1, 7 ve 15. kuyucuklar) yardımıyla fotoğraflar arası normalizasyon yapıldı. “Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA)” kullanılarak PFGE profillerinin dendogramı oluşturuldu ve kümeleşme analizi yapıldı.

3.8. Araştırma Bulguları

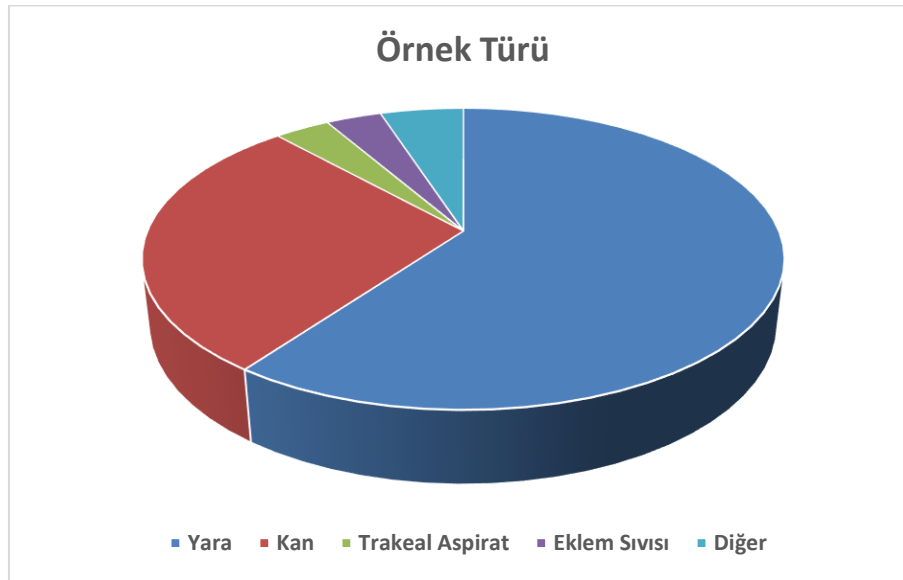
Çalışmamız 2010-2014 yılları arasında Ahi Evran Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesine başvuran hastaların çeşitli numune örneklerinden standart yöntemlerle izole edilmiş, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarlarının kültür koleksiyonlarında saklanan 60 *S.aureus* suşu ile yapılmıştır. Tez çalışmasında kullanılan *S.aureus* suşlarının özellikleri izelge 3.1 de verilmiştir.

Çizelge 3.1. *S.aureus* suşlarının özellikleri

Suş No	Klinik	Örnek
1	ybü	kan
2	ybü	kan
3	intaniye	kan
4	ybü	kan
5	dializ	kan
6	int	kan
7	koroner	kan
8	intaniye	kan
9	çocuk	konj
10	nöroloji	kan
11	ybü	kan
12	ybü	aspirat
13	ybü	yara
14	intaniye	yara
15	çocuk	yara
16	ortopedi	yara
17	ybü	yara
18	çocuk	yara
19	intaniye	yara
20	intaniye	burun
21	intaniye	yara
22	ybü	yara
23	intaniye	yara
24	ortopedi	yara
25	ortopedi	yara
26	cerrahi	yara
27	intaniye	yara
28	çocuk	yara
29	ybü	yara
30	ybü	Yara
31	ybü	yara
32	cerrahi	yara
33	intaniye	yara
34	cerrahi	yara
35	derma	yara
36	ort	yara
37	derma	yara
38	ybü	yara
39	ybü	kan
40	ybü	kan
41	ybü	kan
42	ybü	kan
43	ybü	kan
44	ybü	kan
45	üroloji	yara
46	konj	yara
47	intaniye	yara
48	acil	yara
49	ortopedi	yara
50	Çocuk	yara
51	intaniye	yara
52	Cerrahi	Yara
53	intaniye	yara
54	ort	yara
55	ybü	yara
56	ortopedi	svs
57	intaniye	ost fistülü
58	cerrahi	yara
59	ybü	aspirat
60	ortopedi	svs

Tez çalışmamızda kullandığımız *S.aureus* suşlarının büyük bir bölümü kan ve yara klinik örneklerinden izole edilmiş olup, genellikle yoğun bakım ünitesi ile cerrahi servisinde yatmakta olan hastalardan elde edilmiştir.

S.aureus suşlarının izole edildikleri klinik örneklere göre dağılımı Şekil 3.3’de gösterilmiştir.



Şekil 3.4. *S.aureus* suşlarının klinik örneklere göre dağılımı

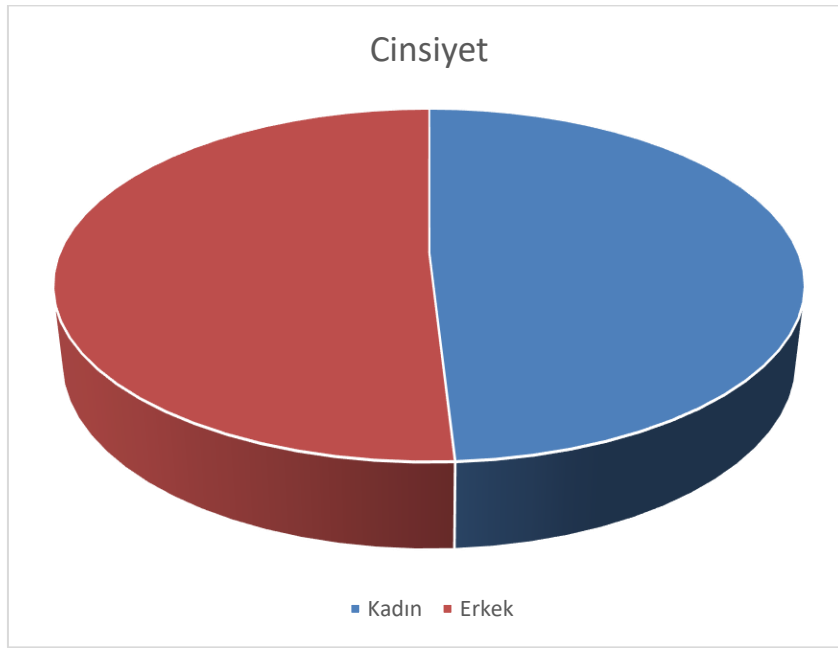
S.aureus suşlarının 36’sı yara, 17’si kan, 7’si diğer klinik örneklerden (trakeal aspirat, eklem sıvısı vb) izole edilmiştir. *S.aureus* suşlarının servis ve kliniklere göre dağılımı Çizelge 3.2 de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. *S.aureus* suşlarının servis ve kliniklere göre dağılımı

	Klinik Örnek							
	Yara	Kan	Trakeal aspirat	Eklem sıvısı	Konjunktiva	Osteal Fistül	Burun	Toplam Sayı(%)
Cerrahi Servis	10	-	-	-	-	-	-	10(16,7)
Yoğun bakım	4	11	2	-	-	-	-	17(28,3)
Enfeksiyon hastalıkları	8	4	-	-	-	1	1	14(23,3)
Pediyatri servisi	4	-	-	-	1	-	-	5(8,3)
Ortopedi servisi	6	-	-	2	-	-	-	8(13,3)
Dermatoloji servisi	3	-	-	-	-	-	-	3(5)
Üroloji servisi	1	1	-	-	-	-	-	2(3,3)
Nöroloji servisi	-	1	-	-	-	-	-	1(1,7)
Toplam sayı (%)	36 (60)	17 (28,3)	2 (3,3)	2 (3,3)	1 (1,7)	1 (1,7)	1 (1,7)	60 (100)

S.aureus suşlarının %28,3'ü yoğun bakım ünitesinden, %23,3'ü enfeksiyon hastalıkları servisinde, %16,7'si cerrahi servisten izole edilmiştir.

S.aureus izole edilen 55 hastanın yaş ortalaması 45'dir. Bu hastaların yaşları 0 ila 85 yaş arasında değişmektedir. *S.aureus* suşlarının cinsiyete göre dağılımı Şekil 3.4'de gösterilmiştir.



Şekil 3.5. *S.aureus* suşlarının cinsiyete göre dağılımı

Suşların 27'si kadın hastalardan, 28'i erkek hastalardan izole edilmiştir.

İzole ettiğimiz *S.aureus* suşlarımızın 1'i MRSA, 59'u MSSA olarak tanımlanmıştır.

S.aureus suşlarının antibiyotiklere direnç oranları Çizelge 3.3 de verilmiştir. Örneklerin antibiyotik direnç dağılımları değerlendirildiğinde %98'i ampisiline, %11.5'i eritromisine, %9.6'sı tetrasikline, %5.8'i klindamisin/siprofloksasine, %3.8'i trimetoprim/sulfametoksazol/Amoksisilin-klavulanik asit/fusidik asite, %1.9'u amikasin/gentamisin/rifampin/sefalotine dirençli olarak saptandı. Bir izolatta metisilin direnci tespit edildi ve bu izolat tüm antimikrobiyallere dirençli olarak belirlendi. Bir izolatta indüklenebilir klindamisin direnci saptanırken, hiçbirinde QD, linezolid, vankomisin direnci tespit edilmedi.

Çizelge 3.3. *S.aureus* suşlarının antibiyotiklere direnç oranları

<u>Çalışılan Antibiyotikler</u>	<u>Dirençli Suş Sayısı</u>	<u>Çalışılan Suş Sayısı</u>	<u>Direnç Oranı (%)</u>
Ampisilin	51	52	%98
Eritromisin	6	52	%11.5
Gentamisin	1	52	%1.9
Cefoxitin	1	51	%1.9
Klavunik asit	3	52	%5.7
Cefuroxime	1	52	%1.9
Ciprofloxacin	3	52	%5.7
Vankomisin	0	52	%100
Amoksisilin/Clavulanik asit	2	52	%3.8
TET	5	52	%9.6
Rifampisin	1	50	%2
Amikacin	1	51	%1.9
Fusidic acid	2	52	%3,8
Chloramphenicol	1	48	%2
Qd	1	48	%2
Mupirocin	1	48	%2
Izd	0	45	%100
Fosfomycin	0	45	%100

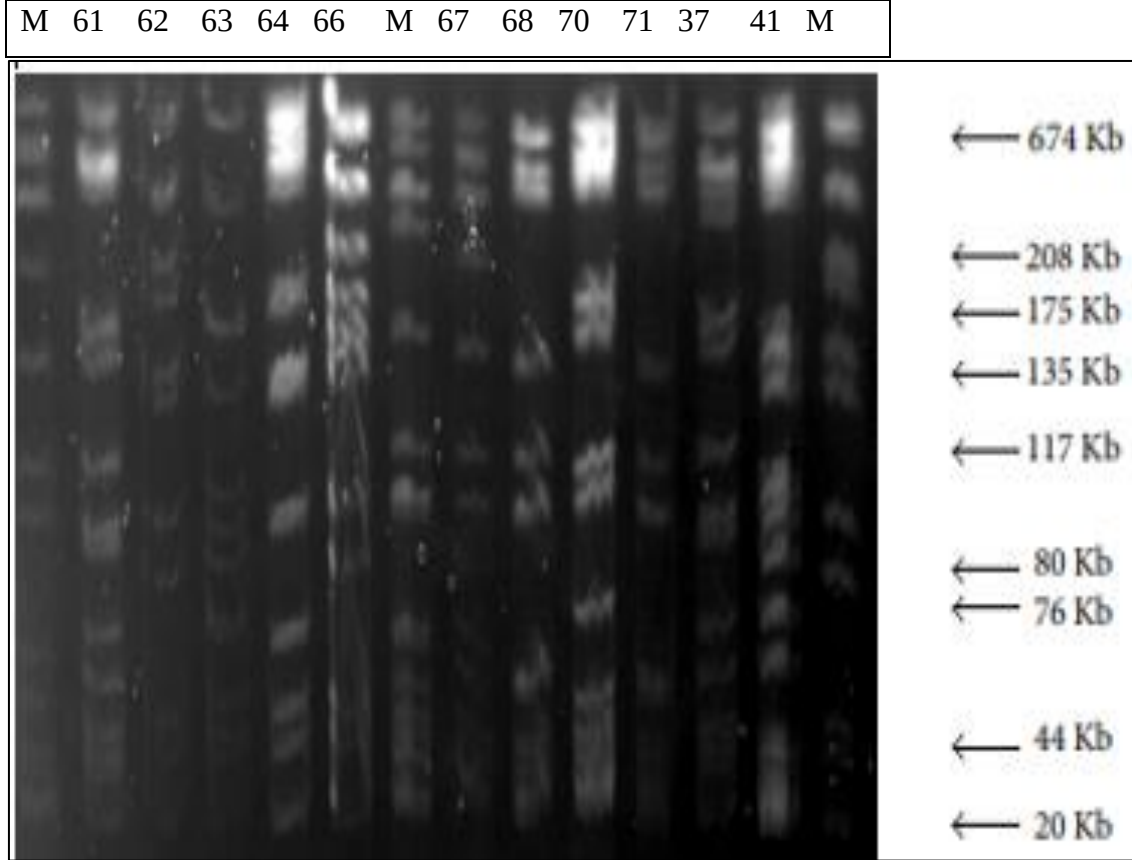
PFGE yöntemiyle tez çalışmasında kullanılan 60 suşun tamamı(%100) 3 kez tekrar yapılarak tiplendirildi. Suşların kromozomal DNA'sı Sma I enzimiyle kesildiğinde büyüklükleri yaklaşık 32 ile 736 kb arasında değişen en az 10 en fazla 17 bant oluştuğu izlendi. Elde edilen bant seyirleri, gözle Wang ve arkadaşlarının belirttiği kriterlere göre değerlendirildi [198]. Buna göre; büyüklükleri ve sayıları aynı olan bantların oluşturduğu seyirleri gösteren izolatlar aynı tip olarak değerlendirildiler. Farklı tipler, baş harflerle belirtilen gruplara dahil edildiler (A, B...). Ana seyirden en fazla üç bantla farklılık gösteren seyre sahip olan izolatlar aynı ana tipin alt tipleri olarak değerlendirildi ve aynı baş harfe değişik numaralar eklenerek oluşturulan alt gruplara (A1, A2,...) dahil edildiler. Ana seyirden dört veya daha fazla bantla farklılık gösteren seyre sahip olan izolatlar değişik bir tip olarak değerlendirildiler ve farklı bir baş harfle belirtilen farklı gruplara (B, C...) dahil edildiler.

Buna göre izolatlar 5 ana grupta (A-E) 12 farklı pulstotipe ayrıldı. Suşların pulstotiplere göre dağılımı Çizelge 3.4 de verilmiştir.

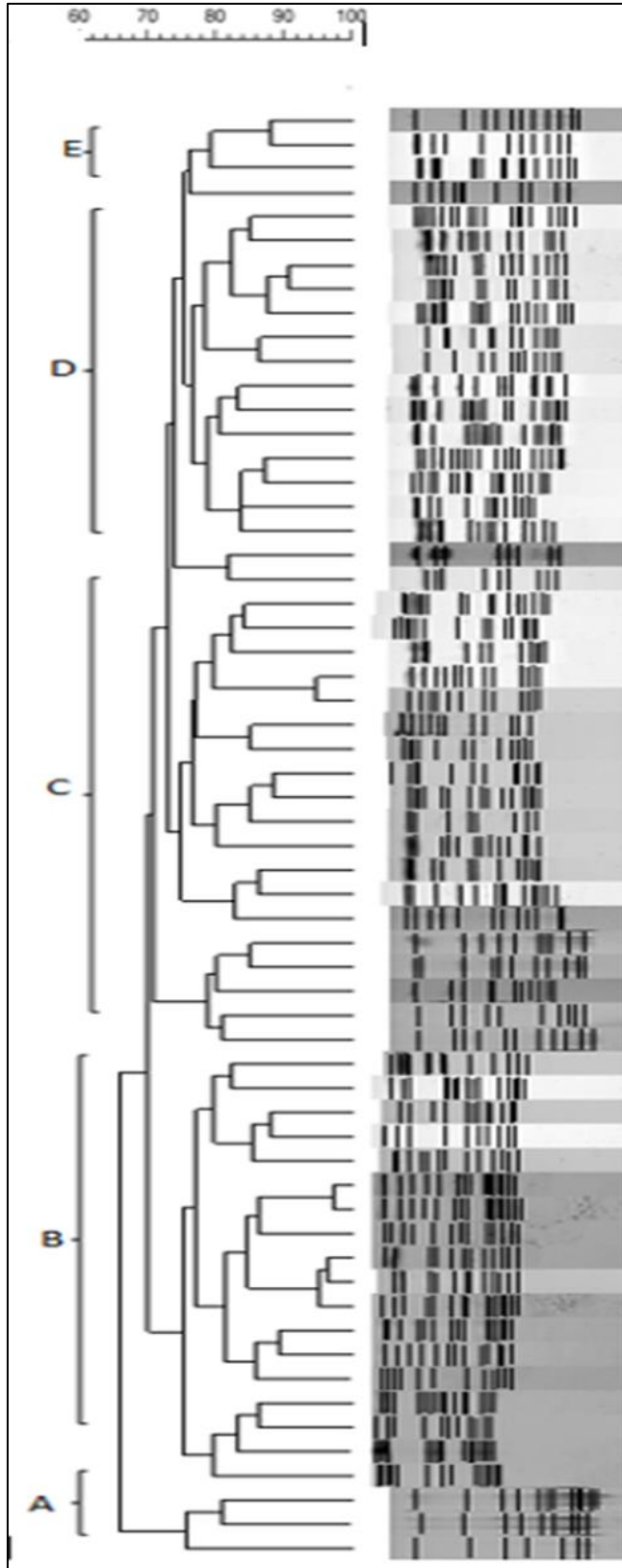
Çizelge 3.4. *S.aureus* suşlarının pulstotiplere göre dağılımı

<u>Tip</u>	<u>Suş Sayısı ve Yüzdesi</u>	<u>Alt tipler</u>
A	3 (%5)	-
B	18 (%30)	B1(4),B2(3),B3(3),B4(3),B5(5)
C	19 (%31.6)	C1(5),C2(3),C3(4),C4(7)
D	16 (%26.6)	D1(2),D2(7),D3(7)
E	4 (%6.6)	-

PFGE sonrası suşlara ait DNA bant görüntüleri Resim 3.12 de, dendogram görüntüsü Resim 3.13 de verilmiştir.



Resim 3.12. PFGE sonrası *S.aureus* suşlarına ait DNA bant görüntüleri



Resim 3.13. PFGE sonrası *S. aureus* suşlarına ait dendrogram görüntüsü

Dendogram, suş örneklerinin PFGE cihazında yürütülmesi sonucu ortaya çıkan ham DNA bant görüntülerinin Bionumerix programında işlenmesiyle elde edilir. Bu dendogram yürütülen 5 farklı DNA bant görüntüsünün birleştirilmesiyle oluşturulmuştur. 60 *S.aureus* suşu A,B, C, D, ve E grubu olmak üzere beş ana gruba, 12 alt gruba ayrılmıştır. Resim 3.1'deki suşların PFGE cihazında rastgele yüklenme sırası M,61, 62,63,64,65,66,M,67,68,70,71,37,41,M şeklindedir. Özetle; resim 3.12'deki gibi toplam 5 adet ham jel görüntüsü bionumerix ile işlenince ortaya çıkan dendogramın çıplak gözle değerlendirilip tüm suşların ana ve alt gruplara ayrılması işlemidir.

Yoğun laboratuvar çalışmaları ve bionumerix programı ile ayrıntılı incelemeler sonucu bakteriyel suşlardan 5 ana grup ve bunlara bağlı 12 alt grup oluşturulmasına rağmen suşlar arasında bant sayısı farklılığı fazla olduğu için suşlar arasında salgın gibi bir bağlantı kurulamamıştır. Dolayısıyla suşun kaynağı olarak hastane ya da üniteleri değil bireysel bazda değerlendirmeler yapılmalıdır. Çünkü etken tek kaynaktan değil birden fazla kaynaktan ortaya çıkmış dolayısıyla salgın olarak değerlendirilememiştir. Suşlar arası bant sayılarındaki farklılıkların fazlalığı bunun somut göstergesidir.



4. TARTIŞMA

Staphylococcus aureus dünyada gerek hastane kökenli gerekse de toplum kökenli enfeksiyonlara sebep olan ve tedavisinde kullanılan hemen hemen tüm antimikrobiyotiklere direnç geliştirebilen önemli bir insan patojenidir.

Antibiyotik direnci, gelecekte dünyanın karşı karşıya olduğu büyük tehditler arasında görülmektedir. Birçok direnç mekanizması kullanan *S. aureus* ve özellikle MRSA suşları dünya çapında büyük bir sorun haline gelmiştir [199]. MRSA’larda direnç mecA geni tarafından kodlanan ve penisilin bağlayan protein 2a (PBP2a)’nın üretimi sonucu ortaya çıkar. Bu proteini içeren suşların beta-laktam grubu antibiyotiklere afinitesi düşük olduğundan tüm beta-laktam ve beta-laktam türevi antibiyotiklere dirence neden olmaktadır [200]. Bu yüzden MRSA kaynaklı enfeksiyonların tedavi maliyetleri MSSA kaynaklı olanlara göre çok daha fazladır. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu tarafından yayınlanan Ulusal Antimikrobiyal Direnç Surveyans Sistemi 2012 ve 2015 verilerine göre ülkemizde MRSA oranı %25’dir [201]. Er ve arkadaşları tarafından 2015 yılında yayınlanan kan kültüründen izole edilen 293 izolat ile yapılmış çalışmada ise %71.7 ile ülkemizdeki en yüksek MRSA oranlarından biri tespit edilmiştir [202]. 60 *S.aureus* izolatı ile yaptığımız çalışmamızda 1 tane suşumuzda MRSA bulunmaktadır. Diğer bütün suşlarımız metisilin duyarlı *S.aureus* suşlarıdır.

S. aureus enfeksiyonlarının tedavisinde 1940’lı yıllardan beri penisilin kullanılmaya başlanmıştır. Çok yüksek başarı oranı sağlanmış olmasına rağmen kısa bir süre sonra penisilinaz enzimi üreten suşların ortaya çıkmasıyla penisilin direnci görülmeye başlanmıştır. Şafak ve arkadaşlarının 2010-2015 yılları arasında kan kültürlerinden izole ettikleri 782 *S. aureus* suşunun %97.4’ünü [203], Er ve arkadaşlarının Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi’nde Eylül 2011 ile Ağustos 2013 tarihleri arasında kan kültürlerinden izole ettikleri suşların %78.5’ini [202], Özkaya ve arkadaşlarının, ise yine kan kültüründen izole edilmiş 32 suştan %96.6’sını penisiline dirençli olarak tespit etmişlerdir. [204] Bizim çalışmamızda ise penisiline direnç oranı % 98’dir.

Glikopeptid grubu antibiyotikler olan vankomisin ve teikoplanin günümüzde MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın kullanılan antibiyotiklerdir [205]. Özellikle vankomisinin MRSA enfeksiyonlarının yaygınlaşmasından sonra sıkça kullanılmasına bağlı olarak dirençli suşlar ortaya çıkmıştır. Ülkemizde yapılan birçok çalışmada MRSA suşlarının vankomisin ve teikoplanine duyarlı olduğu tespit edilmiştir [206,207]. Şafak ve arkadaşlarının 782 *S. aureus* izolatı ile yaptıkları çalışmada *S.aureus* izolatlarında vankomisin ve teikoplanin direnci görülmemiştir [203]. Benzer şekilde bizim çalışmamızda da vankomisin direnci görülmemiştir.

Linezolid, protein sentezini başlangıç aşamasında bloke ederek bakteriyostatik etki gösteren sentetik bir antimikrobiyal ajandır. Derin organ tutulumu, yabancı cihaz varlığı veya uzun süreli linezolid tedavi gibi etkenlerin varlığında linezolid direnci gözlenebilir. Jones ve arkadaşlarının 2007 de 23 ülkenin katıldığı çok merkezli çalışmasında linezolid direnci *S. aureus* için %0,03 olarak bildirilmiştir [208]. Çeşitli klinik örneklerden izole ettiğimiz 60 *S.aureus* suşu incelenmiş ve MSSA olanlarda linezolid direncine rastlanılmamıştır.

Çalışmamızda metisilin duyarlı *S. aureus* suşlarında siprofloksasin direnç oranı %5.7 olarak bulunmuştur. Ülkemizde yapılan çalışmalarda bu direnç oranı %6-%49.5 arasında değişim göstermektedir [203,204].

Dokutan ve arkadaşları klinik örneklerden izole ettikleri 183 *S. aureus* suşu ile yaptıkları çalışmada eritromisin direncini %19 olarak saptamıştır [209]. Bu çalışmaya benzer şekilde, çalışmamızdaki metisilin duyarlı *S. aureus* suşları için eritromisin direnç oranı %11,5'dir.

Çalışmamızda bütün suşlar için gentamisin direnç oranı %1,9 olarak belirlenmiştir. Çalışmamıza benzer olarak Dokutan ve arkadaşları Ocak 2014-Mart 2015 tarihleri arasında izole ettikleri örneklerde gentamisin direncini %9 olarak saptamışlardır. Özkaya ve arkadaşları %29.4, ile yaptıkları çalışmalarda gentamisin direncini çalışmamıza oranla yüksek bildirmişlerdir [204,209].

Tez çalışmamızda kullandığımız yöntem olan PFGE, MRSA izolatlarının tiplendirilmesinde yüksek tekrarlanabilirlik ve yüksek ayırım gücüne sahip bir yöntemdir ve

moleküler tiplendirme metodları içinde altın standart olarak kabul edilmektedir. PFGE yöntemiyle tez çalışmamızdaki 60 *S.aureus* suşunun tamamı tiplendirilmiştir.

Elçinin 2018 yılında, 2003 ve 2004 yıllarında Hacettepe Üniversitesi Erişkin ve Onkoloji Hastaneleri'nde yatan hastalardan elde edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarıyla yaptığı çalışmada PFGE ile değerlendirilen 85 örnekten 9 tanesinin (%10,6) toplum kaynaklı kalan 76 örneğin (%89,4) ise hastane kaynaklı olduğu tespit etmişlerdir [28]. Elçi'nin 2018 yılında yaptığı çalışma neticesinde bulunduğu sonuçlarda iki nokta dikkat çekmektedir. Birincisi 85 örneğin 53 tanesini bünyesinde barındıran bir baskın(dominant) tip (tip A)bulmasıdır. Bu sonuç 2018 yılında Hacettepe Üniversitesi Erişkin ve Onkoloji Hastaneleri'nde yatan hastaların büyük çoğunluğunun (62,3) tek bir kaynaktan enfekte olduğunu gösterir. Bu çalışma bu yönüyle bizim çalışmamızı destekler nitelikte değildir. Fakat bu dominant tip dışında daha az örnekle temsil edilen 3 ana tip ve toplamda 4 ana tipe bağlı 16 farklı pulsotip ya da klon tanımlaması yönüyle de bizim çalışmamıza benzer sonuçlar da bularak çalışmamızı destekler niteliktedir.

Elsa Velazco ve arkadaşları 43 adet *S.aureus* suşu ile bir araştırma yapmışlardır. Yapmış oldukları bu araştırmada hedef suşların aralarındaki ilişki fenotipik ve genotipik yöntemler kullanarak irdelenmiştir. Araştırılması ve analizleri yapılan 43 suşun direnç miktarları belirlenmiştir. (Gentamisin %76.7, eritromisin %74.4, tobramisin %74 ve oksasilin %72.1) PFGE'ye göre de suşları 3 gruba ayrılmışlardır. Netice itibariyle *S.aureus* 'a bağlı olarak meydana gelen ve gelebilecek olan salgınları kontrol etmek için bazı önerilerde bulunmuşlardır. Bunlar; el temizliği ve hijyen kurallarına dikkat edilmesi, yeni doğmuş bebeklerde infeksiyonların tanımlanması ve en değerlisi salgın durumlarında moleküler teknikler kullanılarak araştırmaların yapılmasıdır [210].

Şener ve arkadaşları. 2004 yılında GATA Eğitim ve Araştırma Hastanesinden elde edilen, genetik ve epidemiyolojik ilişkisi bilinmeyen 81 MRSA suşunu PPA, RAPD ve PFGE yöntemleri ile tiplendirmişlerdir. Bu yöntemleri karşılaştırdıklarında PFGE yöntemin diğerlerine göre tekrarlanabilirlik ve ayırım gücü olarak üstün bulmuşlar ve doğrulama testi için PFGE yi önermişlerdir [211].

Strommenger ve arkadaşları yaptığı bir araştırmada metisilin dirençli *S. aureus* suşları ile çalışmışlardır. Araştırmada PFGE metodunu kullanarak 99 suşu incelemişlerdir. PFGE

metodu ile yapılan çalışma sonuçlarını Tenover kriterlerine göre değerlendirerek 99 suşu 74 farklı pulsotip altında toparlamışlardır [21]. Strommenger ve arkadaşlarının 99 suşu 74 grup altında topamaları yani ortak ya da baskın bir grup altında toplayamamaları nedeniyle bizim çalışmamıza benzer sonuçlar ortaya koymuşlardır.

Nuno A. Faria ve arkadaşları çalışmalarında *S. aureus* suşlarını kullanmışlardır. Bu suşları PFGE yöntemiyle incelemişlerdir. PFGE çalışmaları sonuçlarına göre inceledikleri *S. aureus* suşlarının metisiline dirençli olanlarında 32 pulsotip ve 92 alt pulsotip, metisiline duyarlı olanlarında 30 pulsotip ve 63 alt pulsotip belirlemişlerdir [23]. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar çok fazla sayıda pulsotip barındırması nedeniyle bizim çalışmamızda olduğu gibi tek ortak kökeni veya salgını işaret etmemektedir. Bizim çalışmamızı destekler niteliktedir.

İspanya'da bir hastaneden 1998-2002 yılları arasında izole edilen 375 MRSA suşunun genotipik ilişkisini moleküler yöntemlerle inceleyen Perez-Roth ve arkadaşları PFGE yöntemiyle beş klon bulduklarını, çalışmaya başladıkları ilk yılda hastane ortamına Iberian olarak tanımlanan A klonunun hakim olduğunu, ancak beş yıl boyunca yerini EMR SA-16 olarak tanımlanan B klonuna bırakarak prevalansının %1 düştüğünü ve son iki yılda aynı hastane ortamına B klonun hakim olduğunu bildirmişlerdir [212].

Akçimen ve arkadaşları 2010 yılında Adana Çukurova Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde 2005-2007 yılları arasında izole edilen 46 MRSA izolatını PFGE yöntemiyle tiplendirmişler, 42 suşun aynı Major A kümesi içinde yer aldığı ve 4 suşun ilişkisiz olduğunu bulmuşlardır. PFGE analizi sonuçlarına göre üç yıllık çalışma suresince hastane ortamına tek bir MRSA genotipinin hakim olduğu ve hastane infeksiyonlarına yol açtığını bildirmişlerdir [24]. Bu çalışma bizim çalışmamıza benzememektedir. Çünkü bu çalışmada 46 suşun 42'si aynı küme içerisinde tanımlanmasından dolayı bu suşların ortak bir kaynaktan geldiği sonucu ortaya konmuştur.

Tenover ve arkadaşları *S. aureus* suşlarının metisiline duyarlı ve dirençli olanlarının karakterizasyonu amacıyla Amerika Birleşik Devletleri'nde burun kültürlerinden 4 yıl süreyle örnekler toplamışlardır. Topladıkları bu örnekleri PFGE metodu ile incelemişlerdir. Çalışmaları sonucu metisiline duyarlı suşlardan toplam 11 farklı PFGE pulsotipi, metisiline dirençli suşlardan toplam 8 farklı PFGE pulsotipi belirlemişlerdir. Araştırmacılar

aynı zamanda çalışmalarında kullandıkları suşları yıllara göre sınıflandırmışlardır. Araştırmacılar çalışma sonuçlarına göre 2003 ve 2004 yıllarında bir PFGE alt tipi olan USA300'ün burun kolonizasyonlarında arttığını belirlemişlerdir [22].

Metisilin dirençli *S. aureus*'un PFGE'deki alt pulsotipi olan USA300, ilk olarak 2000 yılında Amerika'da tespit edilmiştir. Amerika'da 2005 yılında başka bir çalışma yapılmıştır. 11 hastanedeki hastalardan elde edilen örnekler üzerinden yürütülen bu çalışmaya göre USA300 pulsotipi dominant komünite olarak belirlenmiştir [213]. Bu çalışma bizim çalışmamızdan farklı sonuçlar ortaya koymuştur. Çünkü bu çalışmada suşların ortak bir klonal kölden geldiği sonucu ortaya konmuştur.

A. Hoefnagels-Schuermans ve arkadaşları yaptıkları bir araştırmada genetik olarak ilişkili olduğunu düşündükleri metisiline dirençli *S. aureus* suşlarını PFGE ve antibiyotik direnç testi yöntemleriyle incelemişlerdir. PFGE yöntemine göre 3 farklı pulsotip, antibiyotik direnç testi yöntemine göre ise 11 farklı antibiyotik belirlenmiştir. Netice itibarıyla PFGE yönteminin antibiyotik direnç testi yöntemine göre ayırma gücünün yüksek olduğu sonucuna varmışlardır [214].

Bozdoğan ve arkadaşları Türkiye'nin farklı coğrafi bölgelerindeki 12 merkezden elde edilen 397 MRSA suşu ile yaptıkları çalışmada, SCCmec, PFGE, MLST ve spa tiplendirme yaparak suşların klonal ilişkilerini araştırmışlar ve PFGE'de pulsotip A'nın 363 MRSA suşu ile Türkiye'deki MRSA izolatları arasında en yaygın pulsotip olduğunu, 18 suşun pulsotip B, 11 suşun pulsotip C olduğunu göstermişlerdir. Pulsotip A suşları içerisinde 14 varyant olduğu belirlenmiş; varyant sayıları pulsotip B için 5 ve pulsotip C için 4 olarak saptanmışlardır. Suşların %1.3 (5/397)'ünün eş olmayan tek profile sahip olduğu ve Türkiye'deki yaygın profillerden birine ait olmadığını ve hakim olan klonun spa tipi t030 olarak belirlendiğini bildirmişlerdir [25]. Bu çalışmada araştırılan suşların büyük çoğunluğunun tek bir pulsotip (397 suşun 363'ünün A pulsotipi) olması nedeniyle bizim çalışmamızı desteklememektedir.

Ergon ve arkadaşlarının 2010 yılında Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesinde kan kültürlerinden izole edilen *S.aureus* izolatları arasında en sık görülen antibiyogram profilini taşıyan dokuz MRSA suşu ile yaptıkları çalışmada MRSA izolatları arasında PFGE ile dört farklı patern saptanmasına rağmen esas olarak bir klonal tip ve bunun bir alt

tipinin (patern X ve X') hakim olduğunu, bunun dışında tek bir MRSA izolatında ikinci bir patern (Y) bulunduğunu saptanmışlardır. Bu paternlerin İskoçya MRSA Referans Laboratuvarı arşivlerinde yer alan İspanya, Brezilya ve Macaristan klonlarından da farklı olması nedeniyle bu izolatları arşive “İzmir klonu” olarak ekletmişlerdir [18]. Ergon ve arkadaşları “İzmir klonu” olarak buldukları PFGE tipi ile bizim çalışmamızdan farklı bir sonuç bulmuşlardır. Çünkü bizim çalışmamızda ortak bir klon tespit edilememiştir.

Alp ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptığı bir çalışmada, bir yıllık dönem de altı farklı bölgede bulunan sekiz üniversite hastanesinde izole edilen 54 MRSA izolatı PFGE yöntemi ve spa tipleme ile incelenmiş, çalışma sonun da PFGE yöntemi ile 23 tip bulunmuştur. Araştırmacılar bu tiplerin çoğunun tek bant farklılığı gösterdiğini, böylece farklı bölgelerde izole edilmesine rağmen tek bir predominant klonun çok az değişikliğe uğrayarak bütün ülkede yayıldığı sonucuna vardıklarını bildirmişlerdir [20]. Bu çalışma bizim çalışmamıza benzer sonuçlar bulmasına karşın bizim çalışmamızda olmayan ve suşlar arasında tek bant farkını ortaya koyan bir çalışma olması dolayısıyla bizim çalışmamızın ne karşısında ne de yanında yer alan bir sonuç ortaya koymaktadır.

Zarakolu ve arkadaşları da Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesi'nde 2002-2004 yılları arasında hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen 109 MRSA izolatı ile yaptıkları çalışma sonunda, PFGE ile 13 farklı klon bulduklarını ve izolatların %80'inin “A” klonuna ait olduğunu bildirmişlerdir [19]. Bizim çalışmamızda 12 minör pulstip bulmamıza rağmen suşlar arasında bant sayısı fazlalığından dolayı belli bir kısmının belli bir klona aittir açıklamasını yapılamaz. Dolayısıyla bu çalışmada suşların %80'inin “A” klonuna ait olması nedeniyle bizim çalışmamızı desteklemeyen bir sonuç ortaya koymuştur.

Norazah ve arkadaşları, Malezya da iki hastaneden izole ettikleri 56 MRSA suşunu PFGE ile incelemişler, bir hastanede yedi farklı tip (G,F,E,D,C,B ve A), diğer hastanede ise iki tip (B ve C) bulduklarını ve her iki hastanede en yaygın görülen tipin B olduğunu bildirmişlerdir. Birbirine 800 km uzaklıkta iki hastanede ortak bir tipin görülmesi, hastane içinde ve hastaneler arası yayılım olduğunu ve suşların genotip olarak ilişkili olduklarını göstermektedir [215].

Öztop ve arkadaşları, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Hastanesinde nozokomiyal enfeksiyonlara yol açan 43 MRSA izolatını PFGE ve rep-PCR yöntemleri ile genotipik olarak incelemiş, PFGE ile bir majör tip ve 8 subtip tanımlamışlardır [216].

Obusoyi'nin 2007 yılında yaptığı bir çalışmada Nijerya'daki bir hastanede yatan hastalardan izole ettiği 36 *S.aureus* suşunun 4'ünün MRSA suşu olduğunu ve suşların PFGE sonucu iki tip(H ve L grubu) altında toplandığını bildirmiştir [217].

Mohammed ve arkadaşlarının 2018 yılında Güney Afrika'daki bir hastanede kistik fibrozisli hastalardan izole ettikleri 33 *S.aureus* suşunu agr ve spa tiplendirme, PFGE ve MLST yöntemleriyle incelemişler, *S.aureus* suşlarını MLST ile 8 ayrı sekans tipine PFGE ile 9 ayrı pulsotipe ayırmışlardır. PFGE'de 2 major pulsotip (A ve C) ve 7 minor pulsotip olmak üzere 9 ayrı pulsotip tanımlamışlardır [27]. Bizim çalışmamızda ise 5 majör (A,B,C,D,E) ve 12 minor pulsotip tanımlanmıştır. Dolayısıyla tıpkı bizim çalışmamızda olduğu gibi ortak bir klondan gelmedikleri sonucu ortaya konmuştur. Mogadham ve arkadaşları 2017' de yaptıkları çalışmada Tahran'da bir hastanede yanık ünitesinde yatan hastaların yaralarından izole ettikleri 43 MRSA suşunu PFGE yöntemiyle incelemişler, 5 ortak tip ve 31 birbirinden bağımsız tek tip bulmuşlardır. 43 izolatın 31 'nin birbirinden farklı patern göstermesi MRSA'ların çeşitli kaynaklardan ürediğini ortak bir klondan gelmediklerini bildirmişlerdir [26]. Benzer şekilde çalışmamızda 60 *S.aureus* suşu A,B,C,D ve E kümelerinde tiplendirilmiş fakat bu suşların yakın ilişkili olmadığı bulunmuştur.

Gerçekleştirilmiş ve sonuçlandırılmış tezimizde ortaya konulan en önemli özellikler, çalıştığımız 60 *S.aureus* suşunun salgın niteliği taşımadığı, salgın niteliği taşısaydı majör suş tipi belirlenerek salgının kaynağının tesbit edilebileceği, suşların elde edildiği 5 yıllık dönemde toplumu etkileyecek ciddi bir enfeksiyona neden olmadığı, her suşun bireysel bazda değerlendirilmesi gerektiği, bu açıdan sağlık kuruluşlarının bireysel bazda sağlık tedbirleri alması gerektiği sonucunun tez çıktıları arasında olduğu düşünülmektedir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarlarının kültür koleksiyonlarında saklanan 60 *S.aureus* suşunun antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi ve PFGE yöntemiyle bu suşların aralarındaki klonal ilişkinin belirlenmesi amacıyla yapılan analizler ve bunların sonuçları incelendiğinde;

1. Laboratuvar çalışmalarına başlamadan önce ilk iş olarak koyun kanlı agar besiyerine ekimini yaptığımız suşların *S. aureus* olup olmadığını MALDI TOF MS yöntemiyle tesbit edildi.
2. Disk difüzyon yöntemi olarak Kirby-Bauer yöntemi kullanıldı. Bu yöntemle göre yapılan antibiyograma göre suşların antibiyotik duyarlılık profilleri belirlendi.
3. Moleküler analiz yöntemlerinin en önemlilerinden biri olan PFGE yöntemine göre suşların DNA bant paternleri tesbit edildi ve bu suşlar 5 ana grupta (A-E) 12 farklı pulsotipe ayrıldı.

Kullandığımız PFGE yöntemi MRSA infeksiyonlarının araştırılmasında, *S.aureus* suşlarının epidemiyolojik olarak birbiriyle olan ilişkilerinin ortaya çıkarılmasında yüksek tekrarlanabilirlik ve ayırım gücü bakımından en iyi yöntemlerden biridir.

- PFGE analizine göre suşların yakın ilişkili olmadığı ve salgın niteliği taşımayan hastane veya çeşitli kaynaklardan kazanılmış toplum kaynaklı izolatlar olduğu belirlenmiştir.
- PFGE analizine göre salgın niteliği taşıyan bir sonuç ortaya konulmuş olsaydı salgının kaynağı tesbit edilebilirdi.
- İzolatların neredeyse tamamının penisiline dirençli olduğu, bu nedenle ampirik terapide penisilin yerine amoksisilin-klavulanik asitin etkili olacağı izlenmiştir.
- Sağlık kuruluşlarında lokal izolatların PFGE paternlerinin düzenli olarak takibinin başta *S.aureus* olmak üzere hastane ilişkili enfeksiyonların kontrolü açısından yararlı olabileceği,
- Salgın durumunda salgın suşlarının sporadik suşlardan ayırt edilmesinde faydalı olabileceği düşünülmüştür.
- Suşun kaynağı olarak hastane ya da üniteleri değil bireysel bazda değerlendirmelerin daha doğru olacağı,

- Etkenin tek kaynaktan değil birden fazla kaynaktan ortaya çıkmış dolayısıyla salgın olarak değerlendirilemeyeceği ve suşlar arası bant sayılarındaki farklılıkların fazlalığı bunun somut göstergesi olduğu düşünölmüştür.



KAYNAKLAR

1. Chambers, H.F. (1998). Methicillin resistance in staphylococci: Molecular and biochemical basis and clinical implication. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(4), 781-791.
2. Kılıc, A., Li, H., Stratton, C.W., and Tang, Y.W.(2006). Antimicrobial Susceptibility Patterns and Staphylococcal Cassette Chromosome mec types of, as well as Panton-Valentine Leukocidin occurrence among, methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Children and Adults in middle Tennessee. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(12), 4436-4440.
3. Fey, P.D., Said-Salim, B., and Rupp, M.E. (2003). Comparative molecular analysis of community or hospital acquired MRSA. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 47(1), 196-203.
4. Mandell , G.L., Bennett, J.E., and Douglas, R. (2005). *Staphylococcus aureus* In. *Principles and practice of infectious diseases* (sixth edition), Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 268-275.
5. Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M., and Ito, T. (2001). The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*, 9(10), 486-493.
6. Sakoulas, G., Gold, H.S., Venkataraman, L., Degirolami, P.C., and Eliopoulos, G. (2001). Methicillin- resistant *Staphylococcus aureus*: Comparison of susceptibility testing methods and analysis of mecA-positive susceptible strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 3945-3946.
7. Barber, M. (1961). Methicillin resistant Staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, 14, 385.
8. Cookson, B. (1995). Aspects of epidemiology of MRSA in Europe. *Journal of Chemotherapy*, 3, 95-98.
9. Ippolito, G., Leone, S., Lauria, F.N, Nicastrì, E., and Wenzel, R.P. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: The superbug. *International Journal of Infectious Diseases*, 14, 7-11.
10. Witte, W. (1999). Antibiotic resistance in Gram-positive bacteria: Epidemiologic aspects. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 44, 1-9.
11. Kikuchi, K., Takahashi, N., and Piao, C. (2003). Molecular epidemiology of MRSA strains causing neonatal toxic shock syndrome-like exantematous disease in neonatal and perinatal wards. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(7), 3001-3006.
12. Sobayo, E.I. (1991). Nursing aspect of infection control in developing countries. *Journal of Hospital Infection*, 18(A), 388-391.
13. Göksel, S. (2002). *Saureus*: Mikrobiyoloji, patogenezi ve epidemiyoloji. *İnfeksiyon Hastalıkları Serisi*, 5(3), 97-101.

14. Olive, D.M., and Bean, P.(1999). Principles and applications of methods for DNA-Based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), 1661-1669.
15. Soylu, G.G., Karagöz, A., Ulukanlıgil, M., ve Durmaz, R. (2013). Klinik örneklerden üretilen shigella suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının ve “değişken alanlı jel elektroforezi” genotipik profillerinin araştırılması. *Ankem Dergisi*, 27(3), 113-123.
16. Pfaller, M. (2001). Molecular approaches to diagnosing and managing infectious diseases: practicality and costs. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 7(2), 312-318.
17. Durmaz, R., Otlu, B., Çalışkan, A., ve Gürsoy, N. (2007). Acinetobacter baumannii, escherichia coli ve klebsiella türlerinin moleküler tiplendirmesinde kullanılabilecek kısa süreli “pulsed-field gel” elektroforez (pfge) protokolü. *Ankem Dergisi*, 21(2), 113-117.
18. Ergon, C.M., Biçmen, M., ve Gülay, Z. (2010). Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi’ndeki dominant metisiline dirençli staphylococcus aureus suşunun moleküler yöntemlerle tiplendirilmesi. *Ankem Dergisi*, 24(2), 65-70.
19. Zarakolu, P., Metan, G., Karahan, Z.C., Tekeli, A., and Ünal, S. (2016). Bacterial factors influencing the mortality for methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) bacteremia. *Infectious Diseases*, 48(8), 649–650.
20. Alp, E., Klaassen, C.H., and Doganay, M. (2009). MRSA genotypes in Turkey: persistence over 10 years of a single clone of ST239. *Journal of Infection*, 58(6), 433-438.
21. Strommenger, B., Kettlitz, C., Weniger, T., Harmsen, D., Friedrich, A.W, and Witte, W. (2006). Assignment of Staphylococcus isolates to groups by spa typing, SmaI macrorestriction analysis, and multilocus sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 2533-2540.
22. Tenover, F.C., McAllister, S., Fosheim, G., McDougal, L., Carey, R., Limbago, B., Lonsway, D., Patel, J., Kuehnert, M.J., and Gorwitz, R. (2008). Characterization of Staphylococcus aureus isolates from nasal cultures collected from individuals in the United States in 2001 to 2004. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(9), 2837-2841.
23. Nuno, A.F, João, A.C., Duarte, C., Oliveira, M.R, and De Lencastre, H. (2008). Analysis of Typing Methods for Epidemiological Surveillance of both Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 136-144.
24. Akçimen, B., Nağıyev, T., Biçer, A.T., Yula, E., Yaman, A., ve Köksal, F. (2010). Adana Çukurova Üniversitesi Hastanesinde hastane infeksiyonuna yol açan metisiline dirençli staphylococcus aureus suşlarının pulsed field jel elektroforezi yöntemi ile genotiplendirilmesi. *Türkiye Klinikleri Journal of Medicine Science*, 30(5), 1581-1586.

25. Bozdoğan, B., Yıldız, Ö., Oryaşın, E., Kırdar, S., Gülcü, B., Aktepe, O. ve Arslan, U. (2013). t030, Türkiye'deki hastanelerden izole edilen metisiline dirençli *staphylococcus aureus* izolatları arasında en yaygın spa tipidir. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 47(4), 571-581.
26. Moghadam, S.O., Pourmand, M.R., Douraghi, M., Sabzi, S., and Ghaffari, P. (2017). Utilization of PFGE as a powerful discriminative tool for the investigation of genetic diversity among MRSA strain. *Iran Journal Public Health*, 46, 351-356.
27. Mahomed, G.T., Kock, M.M., Masekela, R., Hoosien, E., and Ehlers, M.M. (2018). Genetic relatedness of staphylococcus aureus isolates obtained from cystic fibrosis patients at a tertiary academic hospital in Pretoria, South Africa. *Scientific Reports*, 8, 3-6.
28. Elçi, D.S. (2018). Metisiline dirençli *staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları ve pulsed field jel elektroforez yöntemi ile tiplendirilmesi. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 42(2), 1-14.
29. Cengiz, A.T. (1999). *Staphylococcus aureus*. Ustaçelebi, Ş. (Ed.), İçinde *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara: Güneş Kitabevi, 339-346.
30. Moreillon, P., and Que, Y. (2010). *Staphylococcus aureus* (Including staphylococcal toxic shock). Mandell, G.L., Bennett, J.E. ve Dolin, R. (Ed.), In *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practice of infectious diseases* (seventh edition). Philadelphia: Churchill Livingstone, 2543-2579.
31. Babacan, K.F. (1997). Enfeksiyon etkeni olan stafilokoklar. *VIII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongre Kitabı*, 326-330.
32. Waldvogel, F.A. (2000). *Staphylococcus aureus*. Mandell, G.L. Bennett, J.E. and Dolin, R. (Ed.), In *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practice of infectious diseases* (fifth ed). Philadelphia: Churchill Livingstone, 2069-2092.
33. Şardan, Y.Ç. (2000). Metisilin dirençli *staphylococcus aureus* infeksiyonlarının epidemiyolojisi ve kontrolü. *Hastane Enfeksiyonları Dergisi*, 4(4), 205-207.
34. Öztürk, R. (2003). Penisilinler. Leblebicioğlu, H., Usluer, G., ve Ulusoy, S. (Ed.), İçinde *Güncel bilgiler ışığında antibiyotikler*. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 307-321.
35. Ünal, S. (2003). *Staphylococcus aureus*: Direnç mekanizmaları. Leblebicioğlu, H., Usluer, G. ve Ulusoy, S. (Ed.), İçinde *Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler*. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 555-570.
36. Sancak, B. (2011). *Staphylococcus aureus* ve antibiyotik direnci. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 45(3), 565-576.
37. Schmitz, F.J., and Jones, M.E. (1997). Antibiotics for treatment of infections caused by MRSA and elimination of MRSA carriage. What are the choices?. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 9(1), 1-19.

38. Tünger, A. (2004). *Staphylococcus aureus*: Mikrobiyoloji, patogenezi ve epidemiyoloji. Ulusoy, S., Usluer, G. ve Ünal, S. (Ed.), İçinde *Gram-pozitif bakteri infeksiyonları*. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 9-68.
39. Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Propcop, G.W., and Woods, G.L. (2005). Gram positive cocci PartI: Staphylococci and related gram positive cocci. In *Colar Atlas and textbook of diagnostic microbiology* (sixth edition). Philadelphia: Lippincott.
40. Garrity, G., and Holt, J.G. (2000). *Bergey's manual of systematic bacteriology: An overview of the road map to the manual*. New York: Bergey's Manual Trust.
41. Erdem, İ., ve Barut-Özel, Y. (2002). Hemodiyaliz hastalarından izole edilen nazal *staphylococcus aureus* suşlarının çeşitli antibiyotiklere in vitro duyarlılıkları. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 22, 47-49.
42. Leloglul, N. (1999). *Staphylococcus ve staphylococcus infeksiyonları*. M. Arda, N. Aydın, A. Ilgaz, A. Minbay, M. Kahraman, M. İzgur, Ö. Akay, S. Diker, N. Leloglul, (Ed.). İstanbul: Medisan Yayınevi.
43. Bilgehan, H. (2005). *Temel mikrobiyoloji ve bağışıklık bilimi uygulamalı konuları ile*. İzmir: Barış Yayınları Fakülteler Baskıevi.
44. Maza, M.L., Pezzlo, M.T., and Baron, E., (1997) *Color atlas of diagnostic microbiology*. USA: Mosby Yearbook Inc.
45. Murray, P.R., Rosenthal, K.S., and Pfaller, M.A. (2005). *Staphylococcus and related organisms in: Medical microbiology*. (fifth edition). USA: Elsevier Mosby.
46. Levinson, W. (2008). *Lange tıp kitapları tıbbi mikrobiyoloji ve immünoloji* (9. Baskı). T. Özgüven (Çev. Ed.). Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri.
47. Kutlu, S.B. (2006). *Çesitli klinik materyallerden izole edilen Staphylococcus aureus suslarında metisilin direnci ve e-test ile vankomisin mic degerlerinin araştırılması*, Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, 8-12.
48. Güleroglul, S. (2001). *Metisiline dirençli stafilocoklarda vankomisin, teikoplanin ve fusidik asit direncinin mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 48-49.
49. Plata, K., Rosato, A.E., and Węgrzyn, G. (2009). *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. *Acta Biochimica Polonica*, 56(4), 597-612.
50. Lowy, F.D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *The New England Journal of Medicine*, 339(8), 520-532.
51. Bokarewa, M.I., Jin, T., and Tarkowski, A. (2006). *Staphylococcus aureus*: Staphylokinase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(4), 504-509.

52. Gülay, Z. (1999). Antimikrobiyal ilaçlara direnç (1. Baskı.). Ş. Ustaçelebi (Ed.), İçinde *Temel ve klinik mikrobiyoloji*. Ankara: Güneş Kitabevi, 91-108.
53. Kuyucu, N. (2007). Antibiyotik Ddirenci. *Enfeksiyon Dergisi*, 1, 33-38.
54. Alen, S., Koneman, E., Janda, W., Schreckenberger, P., Winn, W., Woods, G., and Procop, G. (2006). The gram possitive cocci: Part 1: Staphylococci and related organism. In *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology* (fifth edition), Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
55. Bannerman, T.L. (2003). *Staphylococcus, micrococcus* and other *catalase positive cocci* that grow aerobically. P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, R.H. Tenen. In *Manual of clinical microbiology* (eight edition). Washington DC: Mosby.
56. Erdem, Z. (2011). *Metisilin dirençli staphylococcus aureus suşlarının moleküler tiplendirilmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın, 13-14.
57. Tang, Y., and Stratton, C. (2010). *Staphylococcus aureus*: An old pathogen with new weapons. *Clinics in Laboratory Medicine*, 30, 179-208.
58. Dinges, M.M., Orwin, P.M., and Schlievert, P.M. (2000). Exotoxins of staphylococcus aureus. *Clinical Microbiology Review*, 13(1), 16–34.
59. Bağsever, M. (2011). *Metisiline dirençli staphylococcus aureus izolatlarının “staphylococcal cassette chromosome mec”(SCCmec) analizi ile moleküler tiplendirilmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 12-16.
60. Diep, B.A., and Otto, M. (2008). The role of virulence determinants in community associated MRSA pathogenesis. *Trends Microbiology*, 16(8), 361-369.
61. Boyle-Vavra, S. and Daum, R.B. (2007). Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus: The role of Pantón–Valentine leukocidin. *Laboratory Investigation*, 87, 3–9.
62. Prévost, G., Cribier, B., Couppié, P., Petiau, P., Supersac, G., Finck-Barbançon, V., Monteil, H., and Piémont, Y. (1995). Pantón-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin from Staphylococcus aureus ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infection and Immunology*, 63(10), 4121-4129.
63. Hensler, T, Köller, M., Prévost, G., Piémont, Y., and König, W. (1994). GTP-binding proteins are involved in the modulated activity of human neutrophils treated with the Pantón-Valentine leukocidin from Staphylococcus aureus. *Infection and Immunology*, 62(12), 5281-5289.
64. Dünder, V., ve Öztürk-Dünder, D. (2002). Stafilokok infeksiyonları. A. Willke-Topçu, G. Söyletir ve M. Doğanay (Ed.), İçinde *İnfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi*. Ankara: Nobel Tıp Kitabevi.

65. Kaplan, S.L., Hulten, K.G., and Mason, E.O. (2009). *Staphylococcus aureus* infections. R.D. Feigin, J.D. Cherry, G.J. Demmler-Harrison, and S.L. Kaplan (Ed.). In *Feigin and Cherry's textbook of pediatric infectious diseases* (6th Ed) Philadelphia: Saunders.
66. Sultan, N, (2010). Stafilokoklar ve benzer gram-pozitif koklar. A.C. Başustaoğlu, Ş.T. Yıldırım, M. Tanyüksel ve M. Yapar (Çev. Ed.), İçinde *Tıbbi mikrobiyoloji*. Ankara: Atlas Kitapçılık.
67. Erol, İ., ve İşeri Ö. (2004). Stafilokokal enterotoksinler. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 51, 239-245.
68. Livermore, D.M. (2000). Antibiotic resistance in staphylococci. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 16(1), 3-10.
69. Dokuzoğuz, B. (2004). Metisiline dirençli *staphylococcus aureus*'a bağlı hastane infeksiyonlarının epidemiyolojisi ve kontrolü. G. Usluer, S. Ulusoy ve S. Ünal (Ed.), İçinde *Gram-pozitif bakteri infeksiyonları*. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi.
70. Selçuk, T. (2018). *Staphylococcus aureus* izolatlarının antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzincan.
71. Sheagren, J.N., and Schaberg, D.R. (1998). Staphylococci. S.L. Gorbach, J.G. Bartlett, and N.R. Blacklow (Ed.), In *Infectious diseases*. (2nd Ed). Philadelphia: W.B. Saunders Company.
72. Stevens, D.L., Bisno, A.L., Chambers, H.F., Everett, E.D., Dellinger, P., Goldstein, E.J., Gorbach, S.L., Hirschmann, J.V., Kaplan, E.L., Montoya, J.G., Wade, J.C., and Infectious Diseases Society of America. (2005). Practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft-tissue infections. *Clinic Infection Disease*, 41(12), 1373-1406.
73. Usluer, G. (2004). *Staphylococcus aureus* 'un neden olduğu infeksiyonlar. G. Usluer, S. Ulusoy ve S. Ünal (Ed.), İçinde *Gram-pozitif bakteri infeksiyonları*. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi.
74. Akhan, S.A. (1996). Stafilokok infeksiyonları. A. Willke-Topçu, G. Söyletir ve M. Doğanay (Ed.), İçinde *İnfeksiyon hastalıkları*. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri.
75. Ünal, S., Kim, S.H., and Park, W.B. (2004). Outcome of inappropriate initial antimicrobial treatment in patients with methicillin-resistant *s. aureus* bacteremia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 15, 458-464.
76. Winn, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., and Schreckenberger, P. (2006). *Woods: Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology* (6th Ed). UK: Lippincott Williams & Wilkins.
77. EUCAST European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: MİK ve zon çapı değerlendirmek için sınır değer tabloları. URL <https://www.eucast.org>, Son Erişim Tarihi: 08.10.2019

78. Hung, K.H., Yan, J.J., Lu, Y.C., Chen, H.M., and Wu, J.J. (2011). Evaluation of discrepancies between oxacillin and cefoxitin disk susceptibility for detecting methicillinresistant *staphylococcus aureus*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease*, 30(10), 1181-1184.
79. Ayaz, C. (2008). Beta laktamların genel özellikleri ve penisilinler. A. Willke-Topçu, G. Söyletir ve M. Doğanay (Ed.), İçinde *Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi sistemlere göre enfeksiyonlar* (3. Baskı). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.
80. Gülay, Z. (2003). Hücre duvar sentezini etkileyen antibakteriyeller. *Anknem Dergisi*, 17(3), 192-204.
81. Shahid, M., Sobia, F., Singh, A., Malik, A., Khan, H.M., and Jonas, D. (2009). Beta-lactams and beta-lactamase-inhibitors in current- or potential-clinical practice: A comprehensive update. *Criticals Reviews in Microbiology*, 35(2), 81-108.
82. Chambers, H.F. (2000). Other beta-lactam antibiotics. G.L. Mandel, J.E. Bennett, and R. Dolin (Ed.), In *Principles and Practice of Infectious Diseases* (5th Ed). Philadelphia: Churchill Livingstone.
83. Bush, L.M., and Johnson, C.C. (2000). Ureidopenicilins and beta-lactam/beta-laktamase inhibitor combinations. *Infectious Disease Clinical North America*, 14(2), 409-433.
84. Akova, M., ve Kayaalp, O.S. (2009a). Beta-laktam antibiyotikler II: Sefalosporinler ve diğerleri. O.S. Kayalp (Ed.), İçinde *Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji* (12. Baskı). Ankara: Pelikan Yayıncılık.
85. Wilson, A.P. (1998). Comparative safety of teicoplanin and vancomycin. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 10(2), 143-152.
86. Akova, M., ve Kayaalp, O.S. (2009b). Dar spektrumlu antistafilokokal ve antianaerobik ilaçlar ve polipeptid yapılı antibiyotikler. O.S. Kayalp (Ed.), İçinde *Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji* (12. Baskı). Ankara: Pelikan Yayıncılık.
87. Murray, B.E., and Nannini, E.C. (2005). Glycopeptides (vancomycin and teicoplanin), streptogramins (quinupristin-dalfopristin) and lipopeptides (daptomycin). G.L. Mandel, J.E. Bennett, and R. Dolin (Ed.), In *Principles and Practice of Infectious Diseases* (6th Ed). New York: Churchill Livingstone.
88. Brogden, R.N., and Peters, D.H. (1994). Teicoplanin: A reappraisal of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs*, 47(5), 823-54.
89. Raz, R. (2012). Fosfomycin: An old--new antibiotic. *Clinical Microbiology Infection*, 18(1), 4-7.
90. Yalçın, A.N. (2003). Makrolidler. H. Leblebicioğlu, G. Usluer ve S. Ulusoy (Ed.), İçinde *Güncel bilgiler ışığında antibiyotikler*. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi.
91. Kılıç, S.S. (2003). Linkozamidler. H. Leblebicioğlu, G. Usluer ve S. Ulusoy (Ed.), İçinde *Güncel bilgiler ışığında antibiyotikler*. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi.

92. Schnappinger, D., and Hillen, W. (1996). Tetracyclines: Antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Archives of Microbiology*, 165(6), 359-369.
93. Akova, M., and Kayaalp, O.S. (2009c). Aminoglikozidler. O.S. Kayaalp (Ed.), *İçinde Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji* (onikinci baskı). Ankara: Pelikan Yayıncılık.
94. Shakti, L., and Veeraraghavan, B. (2015). Advantage and limitations of nitrofurantoin in multi-drug resistant Indian scenario. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 33(4), 477-81.
95. Livermore, D.M. (2003). Linezolid in vitro: mechanism and antibacterial spectrum. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(2), 9-16.
96. Leyden, J.J. (1990) Mupirocin: a new topical antibiotic. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 22(5), 879-883.
97. Pankey, G.A. (2005). Tigecycline. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(3), 470-480.
98. Dobie, D., and Gray, J. (2004). Fusidic acid resistance in *staphylococcus aureus*. *Archives of Disease in Childhood*, 89(1), 74-77.
99. Wang, J.L., Tang, H.J., Hsieh, P.H., Chiu, F.Y., Chen Y.H., Chang, M.C., Huang, C.T., Liu, C.P., Lau, Y.J., Hwang, K.P., Ko, W.C., Wang, C.T., Liu, C.Y., Liu, C.L., and Hsueh, P.R. (2012). Fusidic acid for the treatment of bone and joint infections caused by methicillin-resistant *staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40(2), 103-107.
100. Şenol, E. (2002). Siprofloksosin. *Ankem Dergisi*, 16(3), 382-384.
101. Woodcock, J.M., Andrews, J.M., Boswell, F.J., and Brenwald, N.P. (1997). In vitro activity of BAY 12-8039, A new fluoroquinolone. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 41(1), 101-106.
102. Töreci, K. (2003). Kinolonlar dışında nükleik asit sentezini ve stoplazma zarını etkileyen antibakteriyeller. *Ankem Dergisi*, 17(3), 212-215.
103. Aksu, H., ve Candevir, A. (2008). Sulfonamidler, trimetoprim ve trimetoprim/sulfametoksazol. A. Willke-Topçu, G. Söyletir ve M. Doğanay (Ed.), *İçinde Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi sistemlere göre enfeksiyonlar* (3. Baskı). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.
104. Steenbergen, J.N., Alder, J., Thorne, G.M., and Tally, F.P. (2005). Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(3), 283-288.
105. Derbentli, Ş. (2005). Stafilokoklarda antibiyotik direnci: 2003-2004 Türkiye haritası. *Ankem Dergisi*, 19(2), 54-60.
106. Gülay Z. (2008). Gram pozitif bakteri enfeksiyonları: Direnç ve epidemiyoloji. *Ankem Dergisi*, 22(2), 276-286.

107. Gülay, Z. (2001). Antibiyotiklere direnç mekanizmaları ve çözüm önerileri: Betalaktamazlara ve karbapenemlere direnç. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, 5, 2110-2229.
108. Clinical and Laboratory Standarts Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 16th Informational Supplement (M100- S16). URL: <https://www.clsi.org>, Son Erişim Tarihi: 08.10.2019
109. Deurenberg, R. H., Vink, C., Kalenic, S., Friedrichc,A.W, Bruggeman,C.A, Stobberingh, E.E. (2007). The moleculer evolution of methicilin resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*,13, 3, 222-235.
110. Turlej, A., Hryniewicz, W., and Empel, J. (2011). Staphylococcal cassette chromosome mec (Sccmec) classification and typing methods: An overview. *Polish Journal of Microbiology*, 60(2), 95-103.
111. Salmenlinna, S. (2002). *Molecular epidemiology of meticillin-resistant staphylococcus aureus in Finland*. Academic Dissertation, University of Helsinki Faculty of Medicine, Helsinki, Finland.
112. McDougal, L., and Thornsberry, C. (1986). The role of beta-lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase resistant penicillins and cephalosporins. *Journal of Clinical Microbiology*, 23(5), 832-839.
113. Durupınar, B. (2001). Antibiyotiklere dirençte yeni eğilimler. *Klinik Dergisi*, 14(2), 47-56.
114. Lundstrom, T.S., and Sobel, J.D. (1995). Vancomycin, trimetprim-sulfomethoxazole and rifampin. *Infectious Disease Clinical North America*, 9, 747-767.
115. Projan, S.J. (2000). Antibiotic resistance in the staphylococci. V.A. Fischetti (Ed.), In *Gram-positive pathogens*. Washington DC: American Society for Microbiology.
116. Ünal, S. (2009). MRSA problemi. *Ankem Dergisi*, 23(2), 1-12.
117. Kaatz, G.W., Lundstrom, T.S., and Seo, S.M. (2006). Mechanisms of daptomycin resistance in *staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 28(4), 280-287.
118. Özaras, R., ve Tabak, F. (2010). Daptomisin. *Klinik Dergisi*, 23(2), 35-38.
119. Yamazhan, T. (2007). Sulfonamidler ve aminoglikozidler. *Ankem Dergisi*, 21(2), 52-56.
120. Maranan, M.C., Moreira, B., Boyle-Vavra, S., and Daum, R.S. (1997). Antimicrobial resistance in Staphylococci: Epidemiology, Molecular Mechanisms and Clinical Relevance. *Infectious Disease Clinics of North America*, 11(4), 813-836.
121. Lina, G., Quaglia, A., Reverdy, M.E., Leclercq, R. Vandenesch, F., and Etienne, J. (1999). Distrubition of genes encoding resistance to macrolides, lincosamids and streptogramins among staphylococci. *Antimicrobial Agents of Chemotheraphy*, 43, 1062-1066.

122. Nannini, E., Murray, B.E., and Arias, C.A. (2010). Resistance or decreased susceptibility to glycopeptides, daptomycin, and linezolid in methicillin-resistant *staphylococcus aureus*. *Current Opinion in Pharmacology*, 10(5), 516-21.
123. Mendes, R.E., Deshpande, L.M., Farrell, D.J., Spanu, T., Fadda, G., and Jones, R.N. (2010). Assessment of linezolid resistance mechanisms among *Staphylococcus epidermidis* causing bacteraemia in Rome, Italy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(11), 2329-2335.
124. Pullukçu, H., ve Ulusoy, S. (2008). Tigesiklin. *Flora*, 13(3), 3-16.
125. Çetinkaya, Y., ve Ünal, S. (1996). Metisilin dirençli *staphylococcus aureus* infeksiyonları epidemiyoloji ve kontrol. *Flora*, 3, 3-16.
126. Kollef, M.H., and Micek, S.T. (2006). Methicillin resistant *staphylococcus aureus*: A new community-acquired pathogen. *Current Opinion in Infectious Disease*, 19, 161-168.
127. Del Giudice, P., Blanc, V., Durupt, F., Bes, M., Martinez, J.P., Counillon, E., Lina, G., Vandenesch, F., and Etienne, J. (2006). Emergence of two populations of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with distinct epidemiological, clinical and biological features, isolated from patients with community-acquired skin infections. *The British Journal of Dermatology*, 154(1), 118-124.
128. Kowalski, T.J., Berbari, E.F., and Osmon, D.R. (2005). Epidemiology, treatment and prevention of CA-MRSA infections. *Mayo Clinic Proceedings*, 80(9), 1201-08.
129. Hunt, C., Dionne, M., Delorme, M., Murdock, D., Erdreich, A., and Wolsey, D. (1999). Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Minnesota and North Dakota, 1997–1999. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 48, 707–10.
130. Herold, B.C., Immergluck, L.C., and Maranan, M.C. (1998). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. *JAMA*, 279(8), 593-598.
131. İnternet: Healthcare-associated Infections. URL: http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar_mrsa_ca_clinicians.ht, Son Erişim Tarihi: 26.09.2019
132. Okuma, K., Iwakawa, K., Turnidge, J.D., Grubb, W.B., Bell, J.M., and O'Brien F.G. (2002). Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 4289–4294.
133. Naimi, T.S., LeDell, K.H., and Como-Sabetti, K. (2003). Comparison of community and health care-associated methicillin-resistant *staphylococcus aureus* infection. *Jama*, 290, 2976–2984.
134. Paez, A., and Skies, D. (2008). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: From the Hospital to the Community. *Current Infectious Disease Reports*, 10, 14–21.

135. Kocagöz, S., ve Ünal, S. (1997). The practical use of PCR for rapid detection of methicillin resistance among staphylococcal isolates from Turkish hospitals. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(8), 2188-2189.
136. Özkalp, B., ve Baybek, H. (2003). Klinik örneklerden izole edilen *S.aureus* suşlarının çeşitli antibiyotiklere in vitro duyarlılıkları. *Genel Tıp Dergisi*, 13(2), 65-68.
137. Keşli, R., Cander, S., ve Çelebi, S.(2004). Stafilocok suşlarında fusidik asit direnci. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 5, 33.
138. Diler, M., ve Kocabeyoğlu, Ö. (1998). Değişik kaynaklardan izole edilen 1200 stafilocok suşunun türlere ve metisilin direncine göre dağılımı ile beta laktam dışı bazı antibiyotiklere duyarlılık oranları. *Klinik Dergisi*, 11(3), 112-115.
139. Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., and Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(9), 2233-2239.
140. Persing, D.H. (2006). Pulsed-field gel electrophoresis. İçinde *Moleküler mikrobiyoloji: Tanı prensipleri ve uygulamalar*. Ş. Ustaçelebi ve A. Tekeli (Ed.). Ankara: Palme Yayıncılık.
141. Weller, T.M.A. (2000). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* typing methods: which should be the international standart?. *Journal of Hospital Infection*, 44, 160-172.
142. Green, J.N., and Stratton, C.W. (1996). Role of the microbiology laboratory in hospital and epidemiology and infection control. C.G. Mayhall (Ed.), In *Hospital epidemiology and infection control*. London: Williams and Wilkins.
143. Blanc, D.S., Petignat, C., Moreillon, P., Wenger, A., Bille, J., and Francioli, P. (1996). Quantitative antibiogram as a typing method for the prospective epidemiological surveillance and control of MRSA: Comparison with molecular typing. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 17, 654-659.
144. Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Archer, G., Biddle, J., Byrne, S., Goering, R., Hancock, G., Hébert, G.A., Hill, B., and Hollis, R. (1994). Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 407-415.
145. Haşcelik, G. (1997). Hastane enfeksiyonlarında laboratuvarın rolü. *Hastane Enfeksiyonları Dergisi*, 1, 21-30.
146. Arbeit, R.D. (1997). The *staphylococci* in human disease. K.B. Crossley and G.L. Archer (Ed). In *Laboratory procedures for epidemiologic analysis*. New York: Churchill Livingstone.
147. Durmaz, R. (2001). Moleküler epidemiyolojinin prensipleri. R. Durmaz (Ed.), İçinde *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji* (birinci baskı.). Adana: Nobel Tıp Kitabevleri.

148. Şener, K. (2004). Nozokomiyal metisiline dirençli *staphylococcus aureus* izolatlarının tiplendirilmesinde hangi yöntemi kullanalım?. *Türkiye Klinikleri Mikrobiyoloji Enfeksiyon Dergisi*, 3, 15-28.
149. Schlichting, C., Branger, C., and Fournier, J.M. (1993). Typing of *Staphylococcus aureus* by pulsed- field gel electrophoresis, zymotyping, capsular typing and phage typing: resolution of clonal relationships. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 551-555.
150. Arbeit, R.D., Karakawa, W.W., Van, W.F., and Robbins, J.B. (1984). Predominance of two newly described capsular polysaccharide types among clinical isolates of *staphylococcus aureus*. *Diagnostic Microbiology and Infection Diseases*, 2, 85-89.
151. Lee, J.C., Liu, M.J., Parsonnet, J., and Arbeit, R.D. (1990). Expression of types 8 capsular polysaccharide and production of toxic shock syndrome toxin-1 among vaginal isolates of *staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 28, 2612-2620.
152. Mulligan, M.E., and Arbeit, R.D. (1991). Epidemiologic and clinical utility of typing systems for differentiating among strains of methicillin resistant *staphylococcus aureus*. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 12, 20-28.
153. Kıran, A. (2011). *Hastane kökenli metisilin dirençli staphylococcus aureus izolatlarının pulsed field gel electrophoresis ve plazmid profil analiz yöntemleriyle moleküler tiplendirilmesi*. Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
154. Zuccarelli, A.J., Roy, I., Harding, G.P., and Couperus, J.J. (1990). Diversity and stability of restriction enzyme profiles of plasmid DNA from methicillin resistant *staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 28, 97-103.
155. Back, N.A., Linnemann, C.C., and Pfaller, N.A. (1993). Recurrent epidemics caused by a single strain of erithromycin resistant *staphylococcus aureus*: The importance of molecular epidemiology. *Jama*, 270, 1329-1336.
156. Goering, R.V., and Duensing, T.D. (1990). Rapid field inversion gel electrophoresis in combination with an rRNA gene probe in the epidemiological evaluation of *Staphylococci*. *Journal of Clinical Microbiology*, 28, 426-429.
157. Trindade, P.A., McCulloch, J.A., Oliveira, G.A., and Mamizuka, E.M. (2003). Molecular techniques for MRSA typing: Current issues and perspectives. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 7(1), 32-43.
158. Tang, Y.W., Waddington, M.G., Smith, D.H., Manahan, J.M., Kohner, P.C., Highsmith, L.M., Li, H., Cockerill, F.R., Thompson, R.L., Montgomery, S.O., and Persing, D.H. (2000). Comparison of protein A gene sequencing with pulsed-field gel electrophoresis and epidemiologic data for molecular typing of methicillin resistant *staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 1347-1351.
159. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Pulsed-field gel electrophoresis. In *A Molecular Cloning Laboratory Manual* (sekond edition). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

160. Swaminathan, B., and Matar, G.M. (1993). Molecular typing methods. D.H. Persing, T.F. Smith, F.C. Tenover, and T.J. White (Ed). In *Diagnostic molecular microbiology: Principles and applications*. Washington DC: ASM Press.
161. Matushek, M.G., Bonten, M.J., and Hayden, M.K. (1996). Rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(10), 2598-2600.
162. Birren, B., and Lai, E. (1993). *Pulsed field gel electrophoresis: A practical guide*. California: Academic Press Inc.
163. Maslow, J.N., Slutsky, A.M., and Arbeit, R.D. (1993). The application of pulsed field gel electrophoresis to molecular epidemiology. D.H. Persing, T.F. Smith, F.C. Tenover, and T.J. White (Ed.), In *Diagnostic molecular microbiology: Principles and applications*. Washington DC: Lippincott Williams & Wilkins.
164. Leonard, R.B., Mayer, J., and Sasser, M. (1995). Comparison of MIDI Sherlock system and pulsed-field gel electrophoresis in characterizing strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from a recent hospital outbreak. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 2723-2728.
165. Bannerman, T.L., Hancock, G.A., Tenover, F.C., and Miller, J.M.(1995). Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *S. aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 3, 551-555.
166. Hoşoğlu, S. (2010). *Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) prensip ve uygulamalar*. Uygulamalı Moleküler Biyoloji Kongresi Malatya Kurs Kitapçığı, 35-42.
167. Hunter, P.R. (1990). Reproducibility and indicates of discriminatory power of microbial typing methods, *Journal of Clinical Microbiology*, 28, 1903-1905.
168. Ichiyama, S., Ohta, M., and Shimokata, K. (1991). Genomic DNA fingerprinting by pulsed- field gel electrophoresis as an epidemiological marker for study of nosocomial infections caused by methicillin resistant *staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 29, 2690-2699.
169. Wei, M.Q., and Grubb, W.B. (1992). Typing of Australian methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains by pulsed-field gel electrophoresis, *Journal of Medical Microbiology*, 37, 187-192.
170. Bingen, E. (1994). Applications of molecular methods to epidemiologic investigations of nosocomial infections in a pediatric hospital. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 15, 488-493.
171. Prevost, G., Pottecher, B., and Dahlet, M. (1991). Pulsed- field gel electrophoresis as a new epidemiologic tool for monitoring methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit. *Journal of Hospital Infection*, 17, 255-259.
172. Yağcı, A., and Durmaz R. (2001). Ribozomal DNA RFLP analizi (ribotipleme). İçinde *Uygulamalı moleküler mikrobiyoloji* (ikinci baskı). Adana: Nobel Tıp Kitabevleri.

173. Otlu, B. (2007). *Uygulamalı ribotiplendirme*. Moleküler Biyoloji Kongresi Malatya Kurs Kitapçığı, 51-54.
174. Loutit, J.S., and Tompkins, L.S. (1991). Restriction enzyme and Southern hybridization analysis of *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 29, 2897-2900.
175. Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M., and Spratt, B.G. (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 3140- 3145.
176. Aksu, B. (2007). *MLST*. Malatya: Moleküler Biyoloji Kongresi Malatya Kurs Kitapçığı, 47-51.
177. Madigan, M.T., Martinco, J.M, and Parker, J. (2009). Prokaryotic diversity the Archaea. P.F. Corey (Ed.), In *Brock Biology of Microorganisms*. USA: Prentice Hall.
178. Chan, M., Maiden, M.C., and Spratt, B.G. (2001). Database-driven multi-locus sequence typing (MLST) of bacterial pathogens. *Bioinformatics*, 17(11), 1077-1083.
179. Bozkurt, T. (2009). *Hastane kökenli MRSA suşlarında Protein A geni (spa) dizi analizinin klonal ilişkide tespiti rolü*. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana.
180. Deurenberg, R. H., and Stobberingh, E.E. (2008). The evolution of *staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution*, 8,747-763.
181. Frénay, H.M., Bunschoten, A.E., Schouls, L.M., van Leeuwen, W.J., Vandenbroucke- Grauls, C.M., Verhoef, J., and Mooi, F.R. (1996). Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *European Journal of Clinic Microbiology & Infectious Diseases*, 15(1), 60-64.
182. Shopsis, B., Gomez, M., Montgomery, S.O., Smith, D.H., Waddington, M., Dodge, D.E., Bost, D.A., Riehman, M., Naidich, S., and Kreiswirth, B.N. (1999). Evaluation of Protein A Gene Polymorphic Region DNA Sequencing for Typing of *staphylococcus aureus* Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(11), 556–3563.
183. Harmsen, D., Claus, H., Witte, W., Rothganger, J., Claus, H., Turnwald, D., and Vogel, U. (2003). Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 5442-5448.
184. Van Belkum, A., Kluytmans, J., van Leeuwen, W., Bax, R., Quint, W., Peters, E., Fluit, A., Vandenbroucke-Grauls, C., van den Brule, A., and Koeleman, H. (1995). Multicentre evaluation of arbitrarily primed PCR for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 1537-1547.

185. Tambic, A., Power, E.G.M., Tambic, T., Snur, I., and French, G.L. (1999). Epidemiological analysis of methicillin resistant *staphylococcus aureus* in a Zagreb Trauma Hospital using randomly amplified polymorphic DNA typing Method. *European Journal of Clinic Microbiology & Infectious Diseases*, 18, 335-34.
186. Saulnier, P., Bourneix, C., Prevost, G., and Andremont, A. (1993). Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminant than pulsed- field gel electrophoresis for typing strains of methicillin resistant *staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 982-985.
187. Goh, S., Byrne, S., Zhang, J.L., and Chow, A.W. (1992). Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 1642-1645.
188. Schwartzkopf, A., and Karc, H. (1994). Genetic variation in *Staphylococcus aureus* coagulase genes: Potential and limits for use as epidemiological marker. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 2407-2412.
189. Hookey, J.V., Richardson, J.F., and Cookson, B.D. (1998). Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene marker. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 1083-1089.
190. Enright, M.C., Robinson, D.A., Randle, G., Feil, E.J., Grundmann, H., and Spratt, B.G. (2002). The evolutionary history of Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 7687-7692.
191. Ito, T., Katayama, Y., Asada, K., Mori, N., Tsutsumimoto, K., Tiensasitorn, C., and Hiramatsu, K. (2001). Structural comparison of three types of staphylococcal cassette Chromosome mec integrated in the chromosome in methicilin- resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotheraphy*, 45, 1323-1336.
192. Feil, E.J., and Enright, M.C.(2004). Analyses of clonality and the evolution of bacterial pathogens. *Current Opinion in Microbiology*, 7, 308-313.
193. Oliviera, D.C., and de Lencastre, H. (2002). Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin resistant *stapylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotheraphy*, 46, 2155-2161.
194. Bratu, S., Landman, D., Gupta, J., Trehan, M., Panwar, M., and Quale, J. (2006). A population-based study examining the emergence of community-associated methicilin resistant *Staphylococcus aureus* USA 300 in New York City. *Annals of Clinic Microbiology and Antimicrobials*, 30, 5-9.
195. Van der Zee, A., Verbakel, H., van Zon, J. Frenay, I., van Belkum, A., Peeters, M., Buiting, A., and Bergmans, A. (1999). Molecular genotyping of *Staphylococcus aureus* strains: Comparison of repetetive element sequence based PCR with various typing methods and isolation of a new epidemicity marker. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 342-349.

196. Kobayashi, N., Taniguchi, K., and Kojima, K. (1995). Analysis of meticillin resistant *Staphylococcus aureus* by a molecular typing method based on coagulase gene Polymorphisms, *Epidemiology & Infection*, 115, 419-426.
197. İnternet: Otlu, B. Bakteriyel salgınların araştırılması; PFGE yönteminin uygulamaları, problemleri ve sonuçların analizi. URL: <https://www.klimud.org/public/uploads/dosya/1352738657.pdf>, Son Erişim Tarihi: 07.10.2019
198. Wang, J.T., Chen, Y.C., Yang, T.L., and Chang, S.C. (2002). Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 42, 199-203.
199. Parlak, M., Çıkman, A., Güdücüoğlu, H., ve Berktaş, M. (2012). Kan kültürlerinden izole edilen *staphylococcus aureus* suşlarında metisilin ve diğer antibiyotiklere direnç. *Türk Klinik Laboratuvar Dergisi*, 3(1), 6-10.
200. Raeisi, J., Saifi, M., Pourshafie, M.R., Karam, M.R.A., and Mohajerani, H.R. (2015). Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates by turanose fermentation method. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(9), 1-5.
201. İnternet: Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans (UAMDS) Verileri. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Birimi.6. Türkiye EKMUD Bilimsel Platformu, 05-08 Nisan 2017. Antalya. URL: <http://ekmud.org.tr/sunum/indir/557-antimikrobiyal-dirence-global-bakis-ve-turkiye>, Son Erişim Tarihi: 10.10.2019
202. Er, H., Aşık, G., Yoldaş, Ö., Demir, C. ve Keşli, R. (2015). Kan kültürlerinde izole edilerek tanımlanan mikroorganizmaların ve antibiyotik direnç oranlarının belirlenmesi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 45(1), 48-54.
203. Şafak, B., ve Kılınç, O. (2016). 2010-2015 Yılları arasında kan kültürlerinde üreyen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. *Klinik Dergisi*, 29(2), 60-64.
204. Özkaya, E., Tümer, E., Kirişçi, Ö., Çalışkan, A., ve Erdoğan, P. (2015). Son iki yılda Kahramanmaraş Necip Fazıl Şehir Hastanesi'nde kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi. *Türk Hijyen ve Deneyisel Biyoloji Dergisi*, 72(2), 115-122.
205. Shorr, A.F. (2007). Epidemiology of staphylococcal resistance. *Clinic Infection Disease*, 45(3), 171-176.
206. Zencir, M., Arı, A., Yılmaz, N., Avcı, M., Çalık, Ş., Coşkun, A., Bal, F., ve Ağuş, N. (2016). Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotiklere duyarlılığı, hastaların klinik özellikleri ve mortaliteyi etkileyen faktörler. *Ankem Dergisi*, 30(1), 18-23.
207. Güler, İ., Kılıç, H., Atalay, M.A., Perçin, D., ve Erçal, B.D. (2011). Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotiklere in-vitro duyarlılıkları. *Dicle Tıp Dergisi*, 38(4), 466-470.

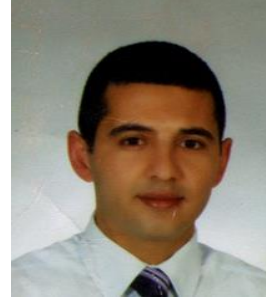
208. Jones, R.N., Kohno, S., Ono, Y., Ross, J.E., ve Yanagihara, K. (2009). ZAAPS International Surveillance Program (2007) for linezolid resistance: results from 5591 Gram-positive clinical isolates in 23 countries. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 64(2), 191-201.
209. Dokutan, A., Haciseyitoğlu, D., Çağ, Y., Pazar Yıldırım, E., Batirel, A., Özer, S., ve Gönüllü, N. (2017). Klinik örneklerden izole edilen stafilocoklarda linezolid direnci ve antibiyotik duyarlılıkları. *Ortadoğu Tıp Dergisi*, 9(1), 19-23.
210. Velazco, E., Nieves, B., Vindel, A., Alviarez, E., Gutierrez, B., and Bianchi, G.(2008) Molecular study of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a neonatal high-risk unit in Merida,Venezuela. *Medical Science Monitor*, 14(9), 25-31.
211. Şener, K., Saraçlı, M.A., Açikel, C.H., ve Doğanç, L. (2004). Metisiline dirençli *staphylococcus aureus* izolatlarının tiplendirilmesinde plazmid profil analizi, RAPD ve PFGE yöntemlerinin ayırım gücü indekslerinin incelenmesi. *Türkiye Klinik Mikrobiyoloji-Enfeksiyon Dergisi*, 3, 1-6.
212. Pérez-Roth, E., Lorenzo-Díaz F., Batista, N., Moreno, A., and Méndez-Alvarez, S. (2004). Tracking methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clones du ring a 5-ye ar pe ri od (1998 to 2002) in a Spanish hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(10), 4649-4656.
213. Tenover, F.C., and Goering, R.V. (2009). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300: origin and epidemiology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64, 441–446.
214. Hoefnagels-Schuermans, A., Peetermans, W.E., Struelens, M.J., Van Lierde, S., and Van Eldere J. (1997).Clonal analysis and identification of epidemic strains of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* by antibiotyping and determination of Protein A gene and coagulase gene polymorphisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 2514-2520.
215. Norazah, A., Liew, S.M., Kamel, A.G., Koh, Y.T., and Lim,V.K. (2001). DNA finger printing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): comparison of strains from 2 Malaysian hospitals. *Singapore Medical Journal*, 42(1), 15-19.
216. Öztop, A., Pınarbaşı, H., Kocagöz, S., Bakıcı, M.Z., ve Bakır, M. (2004). Molecular genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in a teaching hospital in Turkey. *Microbial Drug Resistance*, 10(2), 154-159.
217. Obusoyi, O. (2013). Molecular identication of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* in Benin-City Nigeria. *African Journal Of Clinical and Experimental Microbiology*, 14(1), 1-4.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : TEKİNASLAN, Göksel
 Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 16.05.1980, Ankara
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0 (541) 722 19 80
 Faks : 0 (312) 565 55 53
 e-mail : gtekinaslan@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü	Devam ediyor
Lisans	Dumlupınar Üniversitesi/Fen Fakültesi	2007
Lise	Keçiören Laboratuvar Sağlık Meslek Lisesi	1998

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2002- halen	Sağlık Bakanlığı	Biyolog

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Tekinaslan, G., Taştan, H., Demir, T. ve Kılıç, S. (2019). Klinik örneklerden izole edilen *S.aureus* suşlarının pulsed field gel electrophoresis yöntemi ile klonal ilişkilerinin değerlendirilmesi. 5.Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Poster Bildirisi, 28 Ekim- 1 Kasım, İzmir.



GAZİ GELECEKTİR..